



Mise en oeuvre de concepts de détecteurs optiques de fluorescence intégrant la source de lumière au composant pour des immunoanalyses adaptées à des applications hors laboratoire.

Rémi Galland

► To cite this version:

Rémi Galland. Mise en oeuvre de concepts de détecteurs optiques de fluorescence intégrant la source de lumière au composant pour des immunoanalyses adaptées à des applications hors laboratoire.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. <tel-00332307>

HAL Id: tel-00332307

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00332307>

Submitted on 20 Oct 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UJF

Spécialité : **PHYSIQUE DE LA MATIERE CONDENSEE ET DU RAYONNEMENT**

Préparée au **CEA-Grenoble/LETI/DTBS/STD/LISA**

17, rue des martyrs 38054 Grenoble Cedex 9

dans le cadre de l'Ecole Doctorale de Physique de Grenoble

Présentée et soutenue publiquement par

Rémi Galland

le 22 Septembre 2008

**Mise en œuvre de concepts de détecteurs optiques de fluorescence
intégrant la source de lumière au composant pour des
immunoanalyses adaptées à des applications hors laboratoires**

Directeur de Thèse : Bernard Jacquier

JURY

Dr. Yann BOUCHER	Rapporteur
Dr. Hervé RIGNEAULT	Rapporteur
Pr. Loïc BLUM	Examineur
Dr. Serge VALETTE	Examineur
Dr. Alain MORAND	Invité
Dr. Bernard JACQUIER	Directeur de thèse
M. François PERRAUT	Encadrant

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d’Imagerie et des Techniques d’Acquisition (LISA) du Service des techniques de détection (STD) au sein du Département des Technologies pour la Biologie et la Santé (DTBS) du CEA-Grenoble. A ce titre, je voudrais remercier Jean Chabal, Olivier Peyret et Philippe Rizo pour m’avoir accueilli dans leur service et pour l’ensemble des moyens qu’ils ont mis à ma disposition.

Je remercie également Serge Valette d’avoir accepté de présider le jury de ma thèse ainsi que Yann Boucher et Hervé Rigneault d’avoir été rapporteurs de ce travail et dont les remarques m’ont permis de prendre le recul nécessaire sur mes résultats. Merci aussi à Léon Blum et Alain Morand qui m’ont fait l’honneur d’être membre de mon jury de thèse.

J’adresse mes profonds remerciements à Bernard Jacquier, directeur de ma thèse, pour son aide et son enthousiasme pour mon travail ainsi que pour avoir permis une collaboration sans laquelle une importante partie de mes travaux n’aurait pas vue le jour.

Je tiens à fortement remercier François Perraut, mon encadrant quotidien, pour la confiance qu’il m’a accordée, ses compétences, sa disponibilité par son implication forte dans les moments difficiles mais aussi pour la liberté d’initiative qu’il m’a laissée. Je regretterai les nombreuses discussions plus ou moins en lien avec le travail et toujours enrichissantes que nous avons eues.

Je voudrais remercier l’ensemble des personnes qui m’ont aidé pour mes travaux de simulations. Merci à Pierre Barritault et Stéphane Gétin pour m’avoir donné accès à leurs travaux antérieurs et pour leurs bons conseils lors de mes débuts en thèse. Merci à Enrico Nichelatti de l’ENEA à Rome pour son aide rapide mais décisive au moment où elle a eu lieu. Je n’oublie pas Pierre Benech et, plus particulièrement, Alain Morand pour sa forte implication dans mes travaux malgré son emploi du temps chargé, ainsi que pour son aide irremplaçable sur mes codes de calculs et sa bonne humeur.

Un grand merci à toutes les personnes qui m’ont aidées, ont participé ou encore ont permis la réalisation des nombreuses études expérimentales que j’ai menées au cours de cette thèse.

Je tiens à fortement remercier Joel Bellessa, Matloub Mohamed et Anne Pillonnet des laboratoires LCPML et LPMC de l’université Lyon 1 pour leur gentillesse et leur enthousiasme à chaque réunion de notre collaboration. Merci à Henry Doyeux et Hélène LeCloarec pour leur aide et leurs compétences sur la réalisation d’échantillons OLED.

Un grand merci à tous les biologistes et chimistes pour leur disponibilité et pour m’avoir permis de réaliser des expériences sur des échantillons biologiques. Merci à Guillaume Costa, Guillaume Delapierre, Antoine Hoang,

Frédéric Lesbre, Hervé Boutal, Hervé Volland et Christophe Créminon.

Je voudrais également remercier Henry Grateau pour son aide précieuse et ô combien irremplaçable pour la conception mécanique d'un banc expérimental.

Je tiens à remercier Thierry Flahaut, Emmanuelle Schultz, Sophie Carayon et Anne Planat-Chréten pour leur aide tout au long de mon travail et leurs soutiens dans les moments durs de fin de thèse par exemple mais aussi pour leur très bonne humeur et les nombreuses discussions au repas ou autour d'un thé.

Merci beaucoup à Patrick Pouteau pour ses avis éclairés et ses nombreuses idées qui ont finalement aboutis sur un des résultats importants de mon travail. Je remercie également Amélie Bellemin Comte, Martine Cochet et Stéphanie Garcia pour m'avoir réalisé et caractérisé des lames de Nitrure collant à merveille à mes simulations.

Je tiens à remercier toute l'équipe électronique de l'ancien laboratoire LISA, Alain Bourgerette, Thierry Flaven, Vanceslas Rat, Mathieu Debourdeau, Guillaume Charvet, Sadok Gharbi pour m'avoir fait une place parmi eux dans les premiers mois de mon travail. Je remercie aussi Roland Sauze, Lionel Hervé et Laurent Guyon pour avoir partagé leur bureau avec moi et pour la bonne ambiance qui y régnait.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces trois ans et qui m'ont apportés leurs conseils et qui ont contribué à rendre l'ambiance de travail particulièrement agréable : Nicolas Laustriat et Ducros, Bastien Rachet, Florent Thibault, Rodrigue Roussier, Pierre Gerbaux, Anne Frassatti, Anne Koenig, Damien DuBouëtiez, Jean Hue,

Enfin, je remercie mes amis et ma famille qui m'ont soutenue pendant ce travail et qui m'ont permis de décompresser et d'oublier le travail lorsque cela été nécessaire.

Table des Matières

INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE 1. CONTEXTE DU TRAVAIL DE THESE	12
1.1. Introduction.....	12
1.2. Cahier des charges	12
1.2.1. Définition	12
1.2.2. Applications envisagées.....	13
1.2.3. Contraintes imposées pour une application hors laboratoire	14
1.3. Description d'un système d'analyse	15
1.4. Les étapes de l'analyse.....	17
1.4.2. La reconnaissance moléculaire.....	18
1.4.3. Transformation du signal biologique en un signal physique mesurable.....	22
1.4.4. La mesure	24
1.5. La transduction du signal	24
1.5.1. Méthodes sans traceurs	25
1.5.2. Méthodes avec traceurs	27
1.5.2.1. Méthodes avec marqueurs	28
1.5.2.2. Méthodes sans marqueurs.....	29
1.6. Comparaison des différents traceurs utilisables dans une méthode ASDI	31
1.6.1. Techniques utilisant des traceurs non fluorescents	31
1.6.2. La fluorescence	33
1.6.2.1. Généralités sur la fluorescence	33
1.6.2.2. Intérêts de la fluorescence comme méthode de transduction du signal pour les analyses biologiques. .	38
1.6.2.3. Principe du protocole SPIT-FRI	41
1.7. Problèmes intrinsèques des systèmes existants	44
1.7.1. Les systèmes fortement intégrés.....	44
1.7.2. Principaux concurrents identifiés	45
1.8. Description de notre dispositif instrumental	48
1.8.1. Principe instrumental	48
1.8.2. Avantages et limitations de cet instrument.....	51

1.8.3.	Performances actuelles de l'instrument.....	53
1.8.4.	Systèmes similaires.....	54
1.9.	<i>Objectifs et travail réalisé au cours de la thèse.....</i>	56
1.9.1.	Objectifs de la thèse	56
1.9.2.	Problèmes identifiés	59
1.9.2.1.	Propriétés d'émission de sources organiques de type OLED	59
1.9.2.2.	Collection et confinement du signal de fluorescence dans une couche mince de fort indice de réfraction	62
1.9.2.3.	Problèmes identifiés – conclusion.....	62
1.9.3.	Travail réalisé au cours de la thèse.....	63
CHAPITRE 2.	PROPRIETES D'EMISSION D'UN DIPOLE DANS UNE CAVITE FERMEE ASYMETRIQUE	64
2.1.	<i>Introduction.....</i>	64
2.1.1.	Structure d'une OLED	64
2.1.2.	Collecte de la fluorescence dans un substrat stratifié	65
2.1.3.	Cavité fermée asymétrique (définition).....	66
2.2.	<i>Le modèle dipolaire</i>	68
2.2.1.	Présentation du modèle dipolaire	68
2.2.2.	Effets du milieu extérieur	69
2.2.2.2.	Lors de l'excitation	71
2.2.2.3.	Lors de l'émission	75
2.3.	<i>Effets et méthodes de modification des propriétés spectrale et spatiale d'émission d'une OLED</i>	76
2.3.1.	Qu'est qu'une OLED ?	76
2.3.1.1.	Principe de fonctionnement.....	76
2.3.1.2.	Structure d'une OLED.....	77
2.3.1.3.	Performances	80
2.3.2.	Analyse de l'influence de la directivité et du spectre d'émission des OLED sur les performances de détection	81
2.3.2.1.	Influence de la directivité des OLED sur le phénomène de diaphotie.....	81
2.3.2.2.	Etude de la chaîne photométrique du système	84
2.3.2.3.	Effet du filtrage	87
2.3.2.4.	Effet de l'éclairage direct du détecteur.....	89
2.3.2.5.	Influence de la directivité et du spectre des OLED – Conclusions	93
2.3.3.	Solutions présentées dans la littérature	93
2.3.4.	Justification de la solution choisie	95
2.4.	<i>Présentation du modèle utilisé.....</i>	96
2.4.1.	Notations et conventions	97
2.4.1.2.	Systèmes de coordonnées et repères utilisés	97
2.4.1.3.	Cavités asymétriques (notations).....	99
2.4.1.4.	Approche classique basée sur une décomposition en ondes planes	101
2.4.2.	Calcul des coefficients de Fresnel	102
2.5.	<i>Mise en place des modèles théoriques.....</i>	105

2.5.1.	Puissance d'excitation	105
2.5.2.	Calcul du diagramme d'émission	106
2.5.2.1.	Définition des termes sources et présentation de la méthode de calcul	106
2.5.2.2.	Calcul des champs dans les milieux 1 et 5	108
2.5.2.3.	Diagramme d'émission dans les milieux 1 et 5	110
2.5.2.4.	Premières simulations et limitations du modèle	110
2.5.3.	Spectre de puissance émise par un dipôle	114
2.5.3.1.	Mise en place du modèle	114
2.5.3.2.	Premières simulations	117
2.5.3.3.	Collecte de la fluorescence dans le substrat	119
2.5.3.4.	Limitation du modèle	124
2.5.4.	Energie couplée dans les modes guidés	125
2.5.4.1.	Mise en place du modèle	125
2.5.4.2.	Premières simulations	128
2.5.5.	Mise en place des modèles théoriques – Conclusion	131
2.6.	<i>Conclusion</i>	132
CHAPITRE 3.	ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INSTRUMENT ET MODELISATION	133
3.1.	<i>Introduction</i>	133
3.2.	<i>Mise au point de bancs de mesures</i>	134
3.2.1.	Etude des différentes mesures à réaliser	134
3.2.2.	Banc microscope	134
3.2.3.	Banc en champ proche	135
3.2.4.	Spectrogoniomètre	136
3.3.	<i>Collecte du signal de fluorescence dans le composant</i>	137
3.3.1.	Influence de l'orientation du dipôle	138
3.3.2.	Influence de l'altitude du dipôle	141
3.3.2.1.	Simulations	141
3.3.2.2.	Caractérisations expérimentales	142
3.3.3.	Influence de l'indice de réfraction de la lame de verre	145
3.3.4.	Effet d'une couche mince de fort indice de réfraction	148
3.3.4.1.	Description des composants testés	148
3.3.4.2.	Collecte du signal de fluorescence dans le composant – analyse théorique	151
3.3.4.3.	Collecte du signal de fluorescence dans le composant – caractérisation expérimentale	158
3.3.4.4.	Confinement du signal dans la couche mince	164
3.3.5.	Effets d'une couche mince – Conclusion	170
3.4.	<i>Effet d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED</i>	171
3.4.1.	Description des composants testés	172
3.4.1.1.	OLED réalisées par le DIHS	172
3.4.1.2.	Sources réalisées par le LPCML et le LPMCN	174
3.4.2.	Augmentation du signal émis dans les modes de la cavité	180
3.4.3.	Filtrage spectral	181

3.4.3.2.	Influence de la finesse de la cavité.....	182
3.4.3.3.	Influence de l'épaisseur de la cavité	186
3.4.3.4.	Influence de l'angle d'émission	188
3.4.4.	Amélioration de la directivité	191
3.4.4.1.	Influence de l'épaisseur de la cavité	191
3.4.4.2.	Influence de la finesse de la cavité.....	192
3.4.4.3.	Dispersion angulaire des modes de la cavité	195
3.4.5.	Effet d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED – Conclusions	196
3.4.5.1.	Analyse des propriétés des cavités réalisées sur les performances de l'instrument	196
CONCLUSIONS GENERALES.....		199
ANNEXE A. DESCRIPTION DES BANCS DE MESURES		202
A.1. <i>Le banc microscope</i>		202
A.1.1.	Présentation du banc de mesure.....	202
A.1.2.	Matériel	203
A.1.3.	Protocole de mesure	204
A.2. <i>Banc Champ proche</i>		206
A.2.1.	Présentation du banc de mesure.....	206
A.2.2.	Matériel	206
A.2.3.	Protocole de mesure	207
A.3. <i>Banc Spectrogoniomètre</i>		209
A.3.1.	Présentation de banc de mesure.....	209
A.3.2.	Matériel	210
A.3.3.	Protocole de mesure	210
ANNEXE B. DETERMINATION DE LA DENSITE DE PUISSANCE SPECTRIQUE D'UNE SOURCE		212
REFERENCES		214
LISTE DES ABREVIATIONS		228
LISTE DES NOTATIONS.....		229
LISTE DES MATERIAUX.....		230

Introduction générale

La détection et le dosage de molécules spécifiques dans un environnement donné (eau, air, sang, ...) est l'objet depuis plus de 40 ans de recherches poussées de la part de la communauté scientifique internationale pour des domaines qui n'ont cessé de s'élargir. Le principe de cette détection consiste à faire réagir des molécules cibles (antigènes, anticorps, peptides, fragments d'ADN) présentes dans un liquide avec une surface comportant des petites zones possédant chacune une famille bien déterminée de molécules permettant la capture locale de certaines cibles par reconnaissance moléculaire. La transformation de ces événements biologiques en un signal physique mesurable permet ensuite de révéler la présence et la quantité de molécules cibles dans l'échantillon testé. De nombreuses techniques (radioactive, électrochimique, électrochimoluminescente, magnétique ou encore optique) ont été mises au point pour réaliser cette transduction des signaux biologiques en signal physique en fonction des besoins et contraintes des détections à réaliser.

Aujourd'hui les recherches s'orientent en particulier vers des capteurs permettant la détection simultanée de plusieurs molécules cibles et vers la miniaturisation des dispositifs pour satisfaire un nombre grandissant d'applications présentant chacune leurs contraintes :

- la pharmacie (criblage de molécules au potentiel thérapeutique) et la génomique qui demandent une forte parallélisation des expériences pour le criblage de molécules,
- le diagnostique clinique qui demande une utilisation simple et rapide,
- l'environnement et la santé qui nécessitent une utilisation hors laboratoire grâce à des appareils portables, robustes, autonomes, présentant une forte sensibilité et une bonne spécificité de détection. Ces appareils doivent permettre une analyse en continu (surveillance de sites), dans des endroits parfois difficiles d'accès,
- l'agro-alimentaire qui demande une utilisation hors laboratoire et une détection dans des milieux pouvant être très complexes,
- la défense qui nécessite une utilisation sur le terrain (compacité, robustesse, autonomie, simplicité d'utilisation) et des limites de détection très faibles en fonction des agents pathogènes à détecter.

L'ensemble de ces contraintes fait qu'aujourd'hui les méthodes de transduction les plus utilisées sont les méthodes optiques (fluorescence, résonance de plasmon de surface (SPR)) (Ligler 2002). En effet, l'optique ouvre les perspectives d'une forte miniaturisation des dispositifs tout en autorisant de très bonnes performances de détection et, liée à des systèmes micro fluidiques, une automatisation des protocoles de mesures.

C'est dans ce contexte que le Laboratoire d'Imageries et des Systèmes d'Acquisition (LISA) du CEA Grenoble, en collaboration avec le Laboratoire d'Etude et de Recherche en Immunoanalyse (LERI) du CEA Saclay a développé une instrumentation compacte pour biocapteur basé sur une détection optique par fluorescence. Cet instrument utilise le couplage en champ proche de l'émission de fluorophores dans le substrat afin de collecter et détecter le signal de fluorescence témoin de la présence de molécules cibles dans l'échantillon (Galland 2004, Schultz 2007).

Toutefois, les nombreuses contraintes liées aux applications nécessitant une détection hors laboratoire demandent une plus grande miniaturisation du dispositif actuel ainsi que la possibilité de faire facilement évoluer le nombre et le type de molécules cibles pouvant être détectées, c'est-à-dire le nombre et la taille des différentes zones de reconnaissances moléculaires. C'est cet objectif qui a motivé les travaux qui vont être présentés au cours de ce mémoire de thèse.

Le travail de thèse a alors eu pour but de rechercher les possibilités d'intégrer les sources d'excitations directement dans le composant de l'instrument. Pour cela, les sources organiques de type OLED, de par leurs avantages vis-à-vis des LED inorganiques et leur faculté à être réalisées sur des supports aussi bien en verre qu'en plastique, ont été choisies pour être intégrées. Cependant, les contraintes liées à une détection de fluorescence et à la configuration de l'instrument ont nécessité d'adapter les propriétés spectrales et spatiales d'émission de ces sources. De plus, la collecte des signaux de fluorescence par le composant (Galland 2004) dans lequel on cherche à intégrer les sources d'excitation a demandé de chercher une structure compatible permettant ces deux opérations. Le travail de thèse s'est donc articulé autour de l'étude des propriétés d'émission des molécules luminescentes en fonction de leur environnement afin de connaître et d'optimiser à la fois :

- la collecte de la fluorescence dans le composant de l'instrument,
- les propriétés d'émission des sources organiques et les possibilités de les modifier.

En effet, depuis les travaux de Drexhage et al. (Drexhage 1974), de nombreuses études ont montré la possibilité de modifier les propriétés d'émission de molécules luminescentes selon leur environnement.

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous effectuerons une description détaillée du principe de fonctionnement des biocapteurs et en particulier des moyens de transduction des signaux biologiques en signaux physiques. L'analyse de ces différentes méthodes vis-à-vis des contraintes que nous sommes fixées pour une recherche d'agents pathogènes hors laboratoire nous amènera à présenter le dispositif mis au point au laboratoire, dispositif que nous avons cherché à miniaturiser au cours de ce travail de thèse. Les objectifs du travail seront finalement détaillés en fin de chapitre.

Dans le chapitre deux, une analyse de ces objectifs nous permettra de définir une structure commune permettant d'étudier à la fois les propriétés d'émission des sources OLED et les phénomènes de collecte de la fluorescence dans le composant. Une étude théorique des performances de l'instrument nous permettra ensuite de définir les contraintes de filtrage et de directivité des sources d'excitation pour obtenir des sensibilités de détection acceptable par rapport aux applications visées. A partir de travaux présentés dans la littérature scientifique, différents modèles permettant de simuler les propriétés d'émission d'un dipôle en fonction de son environnement seront ensuite présentés. Ces modèles nous permettront de simuler la fois le couplage en champ proche de la fluorescence dans le composant ainsi que les propriétés d'émission de sources OLED. Nous montrerons alors l'intérêt de la configuration de l'instrument développé au laboratoire par rapport à des instruments similaires

décrits dans la littérature.

Enfin, le chapitre 3 sera consacré à l'étude expérimentale et à la modélisation des propriétés d'émission d'un dipôle en fonction de son environnement. Nous montrerons alors qu'une couche mince de fort indice de réfraction déposée à la surface du composant peut permettre d'améliorer d'un facteur d'environ deux la sensibilité de détection de l'instrument sans toutefois confiner le signal comme nous nous y attendions. D'autre part, l'étude des propriétés d'émission d'un dipôle dans une cavité Fabry Péroต์ nous permettra de définir une solution pour modifier ces propriétés d'émission pour des sources de type OLED dans l'optique de leur intégration dans le composant de l'instrument développé au laboratoire.

Enfin, nous concluons sur le travail effectué et la possibilité d'intégrer les sources d'excitation dans le composant de l'instrument, et présenterons les perspectives que ce travail a apportées au sein du projet et plus généralement dans le domaine des biocapteurs.

Chapitre 1. Contexte du travail de thèse

1.1. Introduction

Le travail de thèse décrit dans ce mémoire s'inscrit dans un des projets du laboratoire d'accueil, le laboratoire LISA (Laboratoire d'Imagerie et des Systèmes d'Acquisitions) du CEA – Grenoble, qui consiste à mettre au point un système de détection d'agents pathogènes utilisable à l'extérieur de laboratoire et ce pour des applications très variées. Ce premier chapitre a pour but de présenter le contexte et les enjeux d'une telle détection afin de positionner le travail qui a été réalisé au cours de cette thèse.

Dans un premier temps, un cahier des charges pour le système d'analyse d'agents pathogènes que l'on cherche à mettre au point sera défini à partir des différentes applications visées. Puis nous montrerons en quoi consiste un tel système d'analyse en nous focalisant plus particulièrement sur l'étape d'analyse de l'échantillon qui constitue notre domaine de compétence.

Différentes méthodes d'analyse décrites dans la littérature seront ensuite présentées et nous les comparerons au cahier des charges qui aura été défini. Cela nous permettra de converger sur une méthode répondant à l'ensemble de nos contraintes : la fluorescence. Puis, après avoir montré les limites intrinsèques des principales techniques concurrentes, l'instrumentation développée dans notre laboratoire sera présentée.

Enfin, une description des objectifs spécifiques du travail de thèse sur l'instrument mis au point dans le laboratoire LISA sera effectuée.

1.2. Cahier des charges

1.2.1. Définition

Les systèmes d'analyse biologique d'échantillons sont des instruments permettant de détecter spécifiquement la présence de molécules d'intérêt ou d'agents pathogènes, appelés "analytes" ou "molécules cibles", dans un échantillon donné. Ces systèmes d'analyses regroupent différentes fonctions de manipulations d'un échantillon, dont le système de détection des agents pathogènes à proprement parler, qui est généralement appelé biocapteur ou biopuce.

D'après la définition donnée par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), les biocapteurs, ou biopuces sont des « instruments compacts conçus pour produire un signal, discret ou continu, proportionnel à la concentration d'un analyte ou d'un groupe d'analytes, présents dans un échantillon qui combine un élément

d'origine biologique appelé biorécepteur et un transducteur représentant le mode de détection » (Thevenot 2001). Le biorécepteur est capable d'interagir spécifiquement avec un analyte donné et d'induire de ce fait une modification d'ordre chimique ou physique. Le transducteur est, quant à lui, l'élément qui exploite cette modification pour la transformer en un signal physique mesurable (optique, électrique, ...).

Il est classiquement établi que le terme biocapteur définit plus particulièrement les instruments permettant la détection d'un ou de quelques analytes, alors que le terme "microarrays" représente des composants permettant une importante parallélisation de ces mesures. Par exemple, la société Affymetrix a développé et commercialisé une biopuce permettant la détection de plus de 200 000 séquences d'ADN différentes sur une surface de 25 mm². Le terme "biopuce" est, quant à lui, un terme plus générique utilisé pour désigner tous les microsystèmes appliqués à des applications en biologie. Ces microsystèmes effectuent l'ensemble des étapes depuis la transformation d'un échantillon biologique (purification, changement de phase, amplification, ...) jusqu'à la détection des analytes présents dans cet échantillon.

1.2.2. Applications envisagées

Depuis plus de trente ans, les systèmes d'analyses biologiques ont connu un essor très important car leurs domaines d'applications sont multiples. Le diagnostic clinique (identification de pathogènes chez l'homme ou l'animal) est évidemment un domaine pour lequel ces systèmes constituent un outil puissant. La génomique, pour l'établissement de cartes du génome, l'identification de nouveaux gènes, ou encore l'étude de la fonction de gènes et leur séquençage, sont aussi très demandeurs de ce type de technologies. De même, le domaine de la pharmacie pour le criblage de molécules d'intérêt représente un champ d'application important pour les biopuces, car ils requièrent une parallélisation massive des analyses.

Aujourd'hui, de nouveaux domaines d'applications se sont développés, impliquant de nouvelles contraintes sur les instruments liées à l'environnement d'utilisation et aux types de molécules que l'on veut détecter. En effet, de nombreux travaux de recherche visent à mettre au point des systèmes permettant d'effectuer des analyses hors laboratoire, voir directement sur le terrain, comme :

- les analyses chez le médecin ou dans des points de santé non exécutées par un spécialiste,
- les analyses à domicile (comme le diagnostic de grossesse, le dosage du diabète, ...),
- les analyses dans les ambulances pour préparer les hospitalisations d'urgence,
- les applications militaires sur le terrain des opérations (pour la protection des troupes) ou sur le territoire (protection civile),
- le suivi de l'environnement pour la détection de polluants d'origines industrielle, agricole ou naturelle,
- le suivi des chaînes agroalimentaires.

Il est par ailleurs nécessaire de pouvoir détecter des analytes de nature très variée :

- Protéines, toxines,
- Virus ou bactéries,
- Brins d'ADN,
- Gaz, ...

Cependant, malgré les efforts consentis ces dernières années sur les instruments conventionnels pour améliorer

leur compacité, leur ergonomie, et mettre au point des méthodes de traitement de l'information automatique, il n'est pas encore envisageable aujourd'hui de les utiliser sur le terrain.

C'est dans ce contexte, et pour les applications définies ci-dessus, que le CEA a recherché à mettre au point un système de détection d'agents pathogènes utilisable hors laboratoire.

1.2.3. Contraintes imposées pour une application hors laboratoire

Détaillons, à présent, ces contraintes imposées sur les dispositifs de détection d'agents pathogènes par ces nouvelles applications hors laboratoire.

Ils doivent être extrêmement compacts et robustes afin d'être transportables directement sur le terrain où l'on désire faire les mesures, voire portables par un unique individu et faciles d'utilisation pour être manipulables par des non-spécialistes. Un des axes de recherche pour y parvenir est alors d'intégrer au maximum les fonctions de détection dans le composant du biocapteur afin de réduire les dérèglages possibles, ainsi que les interfaces opto-mécaniques et les composants optiques conventionnels généralement volumineux (amélioration de la robustesse et de la compacité du dispositif).

Ces dispositifs doivent être autonomes (utilisation potentielle sur batteries) pour des applications de surveillance sur de longues périodes de temps et dans des zones non desservies par un réseau électrique. Il sera donc nécessaire de choisir des composants à faible consommation énergétique (LEDs, photodiodes MOS, détecteurs non refroidis) afin d'améliorer l'autonomie de tels systèmes.

D'autre part, certaines de ces nouvelles applications consistent à réaliser des opérations de surveillance (protection civile sur le territoire, suivi de l'environnement) qui nécessitent une lecture en continu de l'échantillon, afin de pouvoir donner une alerte dès l'apparition des agents pathogènes recherchés. La réalisation de telles mesures en continu impose alors des contraintes sur la méthode d'analyse utilisée. Il est nécessaire de pouvoir effectuer la lecture de l'échantillon en temps réel, par exemple en réduisant le nombre d'étapes de la réaction biologique : une étape de lavage de l'échantillon n'est pas compatible avec une lecture en continu.

Les dispositifs doivent ensuite être robustes tant au niveau de l'instrumentation qu'au niveau de l'analyse et du rendu des résultats et posséder de bonnes sensibilité et spécificité de détection pour rapidement signaler un problème (surveillance du territoire, détection et suivi de pollutions, ...). Il faut donc limiter au maximum la contribution des signaux non spécifiques (adsorption non spécifique, adsorption non localisée, autofluorescence de l'échantillon,...) qui peuvent fortement limiter les performances de certaines méthodes d'analyses comme nous le verrons par la suite.

Enfin, les applications hors laboratoire demandent des instruments capables de détecter plusieurs agents pathogènes sur une même puce afin de limiter le nombre de systèmes en parallèle. Il est donc nécessaire de développer des instrumentations multiplexes, c'est-à-dire capable de détecter de manière indépendante et simultanée plusieurs agents pathogènes dans un échantillon.

En résumé, le système que l'on cherche à mettre au point doit répondre aux contraintes suivantes :

- il doit être aisément transportable hors laboratoire, c'est-à-dire avoir une **instrumentation compacte et robuste**,
- il doit être **ergonomique** pour être facilement utilisable sur le terrain et avoir une **faible consommation**

d'énergie afin de pouvoir réaliser des mesures de surveillance de façon autonome,

- il doit avoir de très bonnes **sensibilité** et **spécificité** de détection,
- il doit permettre la détection simultanée et indépendante de plusieurs agents pathogènes, c'est-à-dire être **multiplexe**,
- enfin, il doit être **capable d'effectuer des mesures en continu** pour les applications de surveillance.

Une description du principe de fonctionnement global d'un système d'analyse biologique va maintenant être effectuée. Nous nous focaliserons ensuite sur l'étape de détection des agents pathogènes qui constitue l'étape clé pour la mise au point de systèmes utilisables hors laboratoire ce qui nous permettra de justifier le choix de la méthode de détection retenue pour notre instrument. Les objectifs du travail de thèse seront finalement détaillés à la fin de ce chapitre.

1.3. Description d'un système d'analyse

Un système d'analyse biologique, tel que nous l'avons défini, doit permettre de détecter spécifiquement la présence de molécules cibles dans un milieu donné. Cela nécessite plusieurs étapes pour collecter, détecter puis analyser les résultats. On peut ainsi définir quatre étapes principales dans tout système d'analyse biologique (voir Figure 1.1) :

- i. une étape de collection ou de prélèvement d'un échantillon,
- ii. une étape pré-analytique de traitement de l'échantillon,
- iii. une étape d'analyse qui est l'étape de détection des molécules cibles dans l'échantillon,
- iv. une étape d'interprétation des mesures.

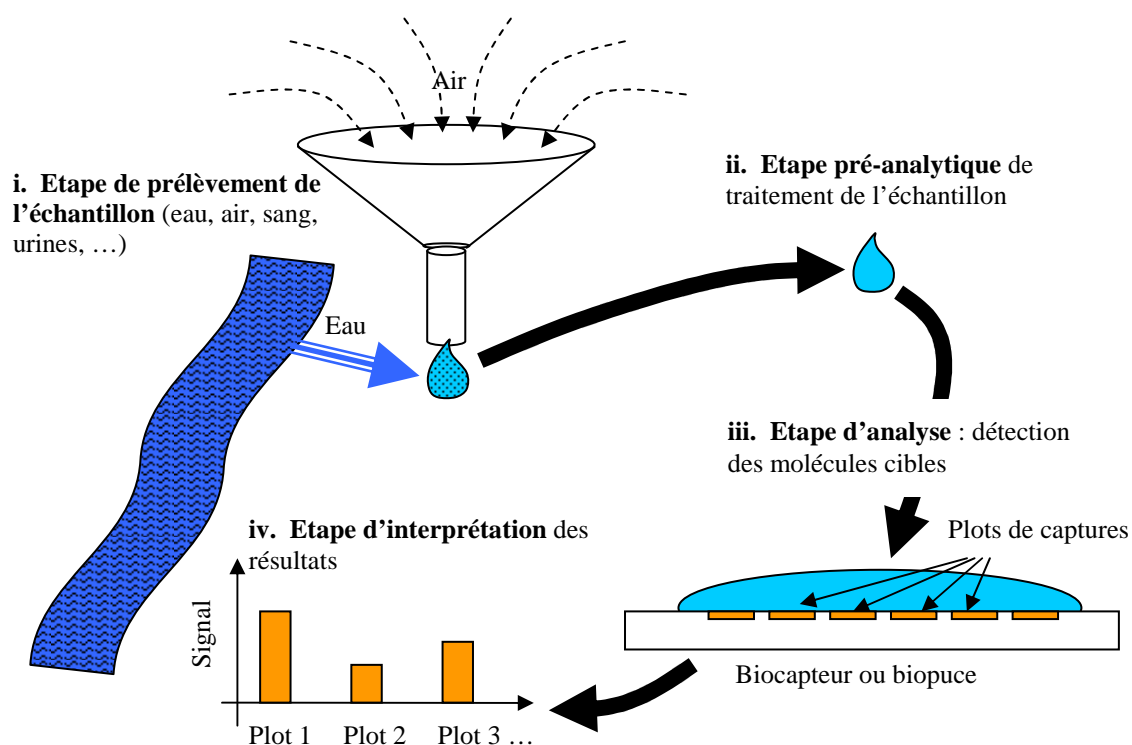


Figure 1.1. Schéma simplifié des différentes étapes du déroulement d'une analyse biologique, du prélèvement de l'échantillon à l'interprétation des résultats.

Les étapes i et ii se justifient par la diversité et la complexité des milieux pouvant contenir les agents pathogènes à détecter :

- milieux aqueux comme les eaux de rivière ou de baignades, ou encore l'eau potable,
- milieux très complexes comme le sang, les urines, le lait, ou encore des aliments pour la recherche de bactéries dans les chaînes agroalimentaires,
- milieux gazeux comme l'air pour le suivi de la pollution atmosphérique, la détection de gaz, ou la surveillance du territoire.

Suivant la nature du milieu d'analyse, il peut être nécessaire de collecter un échantillon et de le traiter avant toute opération de détection d'agents pathogènes. Cela consistera par exemple à aspirer un important volume d'air et concentrer les différentes particules ainsi collectées dans un faible volume de solution qui pourra être ensuite plus facilement manipulable lors de l'étape de détection des cibles. Pour d'autres types de milieux, comme le sang, les urines ou encore le lait, des étapes de purification ou de filtrage peuvent être nécessaires afin de limiter les contributions non spécifiques des différentes molécules naturellement présentes dans ces milieux (sels, globules, graisses, ...). L'analyse d'aliments peut, quant à elle, nécessiter des étapes de lyse ou de digestion afin de transformer l'aliment solide en une solution manipulable. Enfin, pour certaines applications, des étapes d'amplification sont utilisées afin d'améliorer les limites de détection. Par exemple, pour la détection d'ADN, il est possible d'effectuer une étape de PCR (Polymerase Chain Reaction) qui permet de multiplier les brins d'ADN déjà présents dans l'échantillon. Cette amplification des brins d'ADN cibles dans l'échantillon offre alors la possibilité d'en détecter plus facilement de très faibles quantités.

Après avoir collecté, concentré et mis en forme l'échantillon à analyser, vient l'étape d'analyse (étape iii), c'est-à-dire l'étape de détection des molécules cibles. Cette étape est très importante dans les systèmes d'analyse car c'est elle qui permet de conclure sur la présence ou non des analytes dans l'échantillon. C'est à ce niveau que l'on parle de biocapteurs ou microarrays.

Le principe de cette étape est de faire réagir les molécules cibles présentes dans l'échantillon avec une surface comportant plusieurs zones appelées « plots ». Chaque plot comporte une famille bien déterminée de molécules permettant la capture locale et spécifique de certaines cibles par reconnaissance moléculaire.

Enfin, une dernière étape (étape iv) d'interprétation des mesures est nécessaire afin de statuer sur la présence et la quantité de molécules cibles dans l'échantillon. On appellera dosage le fait de déterminer la quantité de cibles dans un échantillon.

Nous nous intéresserons dans la suite du rapport exclusivement à l'étape d'analyse de l'échantillon (étape iii) pour laquelle un système complet (instrumentation et protocoles) a été mis au point au laboratoire.

1.4. Les étapes de l'analyse

Le principe de fonctionnement d'un biocapteur peut être représenté par la Figure 1.2. Tout d'abord, une étape de reconnaissance moléculaire permet la détection des molécules cibles présentes dans l'échantillon par des molécules spécifiques appelées sondes de capture. Une transformation de ces événements biologiques en un signal physique mesurable permet ensuite de détecter la présence des molécules cibles immobilisées en surface : c'est l'étape de transduction du signal. Cette étape est très importante dans les biocapteurs car c'est en grande partie elle qui détermine les performances (sensibilité et spécificité de détection, compacité, robustesse, caractère multiplexe, utilisation en continu) du biocapteur. Enfin une étape de mesure du signal physique permet de remonter à la présence (détection) et à la concentration (dosage) des analytes dans l'échantillon.

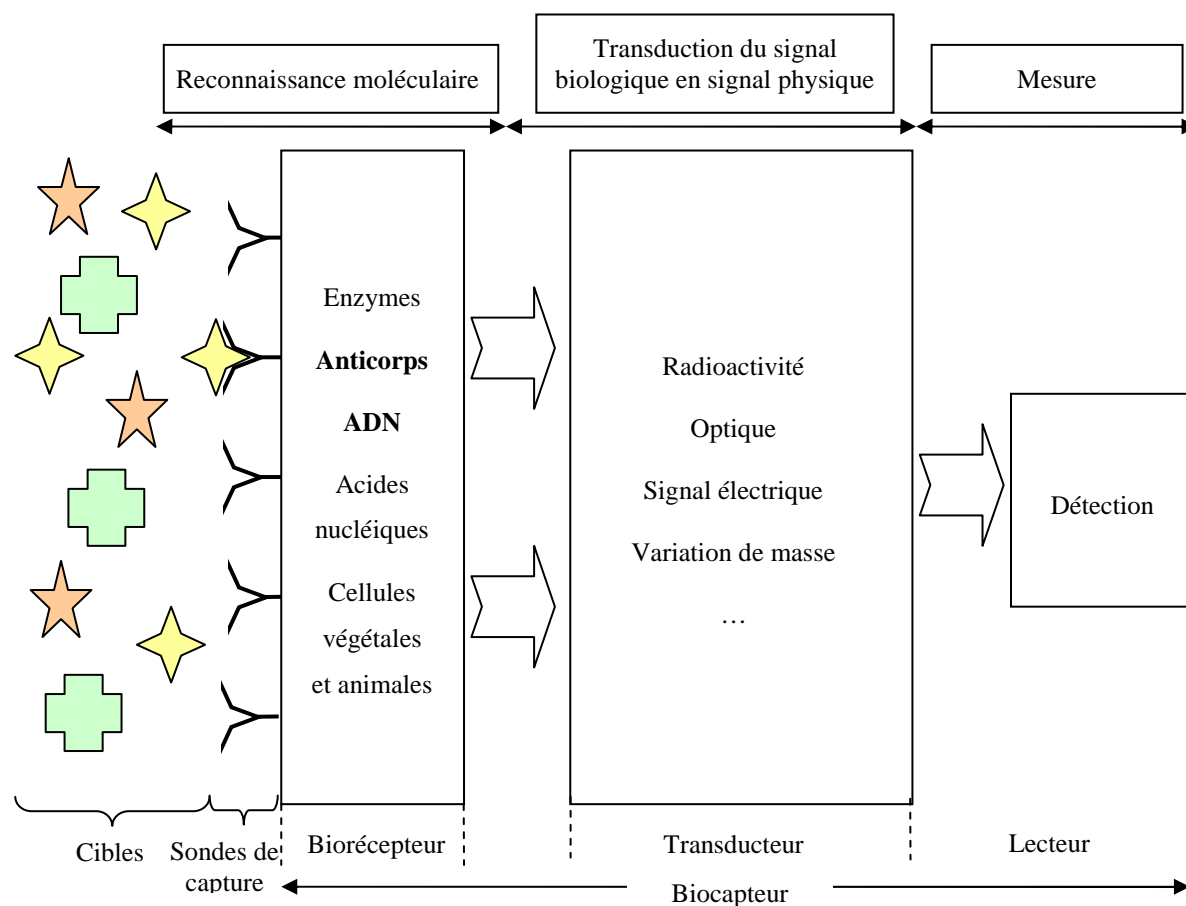


Figure 1.2. Représentation schématique d'un biocapteur : l'analyte interagit avec le biorécepteur induisant une modification d'ordre chimique ou physique qui est transformée en signal mesurable par le transducteur (d'après Neuburger 2006).

1.4.2. La reconnaissance moléculaire

Le fonctionnement d'un biocapteur repose sur une interaction spécifique entre un biorécepteur et une molécule cible ou analyte, interaction qui correspond à une reconnaissance moléculaire. On peut définir la réaction de reconnaissance moléculaire comme la propriété qu'ont deux molécules à s'associer pour former un duplexe, par exemple un couple anticorps/antigène ou deux mono brins complémentaires d'ADN. L'analogie du principe clé/serrure, introduit en 1894 par Fisher pour l'immunologie (Zuber 1997), est souvent utilisée pour expliquer le caractère spécifique de cette interaction :

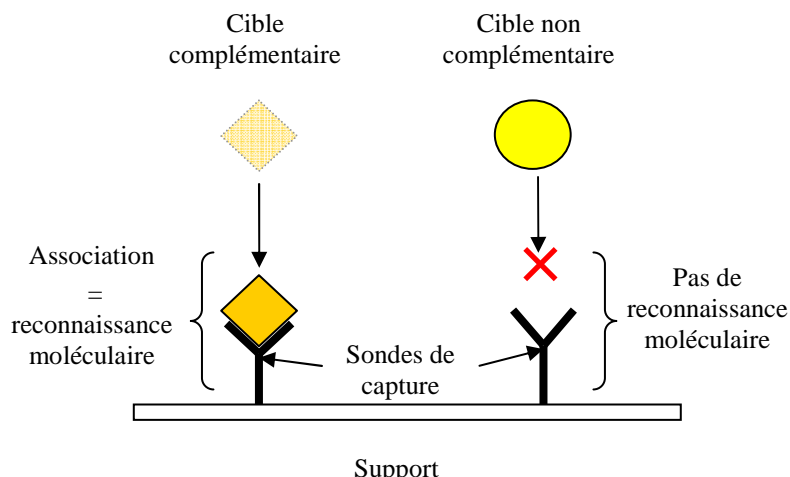


Figure 1.3. Illustration du principe de reconnaissance moléculaire : à gauche « la clé et la serrure » correspondent : il y a reconnaissance moléculaire. À droite, il n'y a pas de correspondance et donc pas de reconnaissance moléculaire (Roncali 2007). Dans cette figure, nous avons choisi d'illustrer le principe de reconnaissance moléculaire via une complémentarité morphologique ; au niveau moléculaire, cette complémentarité a lieu entre des liaisons chimiques non covalentes.

En biologie moléculaire, les termes "molécules cibles" ou "analytes", et "sondes de capture" sont employés afin de désigner respectivement les molécules à détecter (les "clés") et les molécules permettant leur détection (les "serrures").

Cette reconnaissance moléculaire peut avoir lieu en milieu homogène (par exemple une phase liquide), ou bien en milieu hétérogène (sur un support solide) (cas de la Figure 1.3). Lorsqu'elle se fait sur support solide, il devient possible de définir différentes zones de reconnaissance moléculaire ou "plots biologiques" sur lesquelles sont déposées des sondes de capture différentes. En ADN, il est ainsi possible de réaliser des puces possédant jusqu'à 10^6 plots différents sur une surface de 25 mm². Les systèmes basés sur le principe de reconnaissance moléculaire anticorps/antigène peuvent quant à eux présenter jusqu'à plusieurs dizaines de zones de reconnaissance différentes sur un même support (Rowe 1999, Tschmelak 2005). La différence de densité de zones de captures en immunologie par rapport aux puces à ADN provient principalement de la difficulté de produire un grand nombre d'anticorps différents. De plus, il est aujourd'hui possible de synthétiser des séquences d'ADN directement sur le composant de la biopuce (Pease 1994), ce qui permet de réduire le nombre d'étapes de fabrication, alors que ce n'est pas envisageable en immunologie.

Plusieurs types de molécules peuvent être utilisés comme sondes de capture. Cependant, la plupart des biocapteurs ou biopuces utilisent soit des mono brins d'ADN (on parle alors de biopuces à ADN) soit des anticorps (on parle alors d'immunocapteurs).

L'utilisation de mono brins d'ADN comme sondes de capture

L'ADN est une molécule formée de deux brins complémentaires enroulés en une double hélice (voir Figure 1.4 a). Chaque brin d'ADN est constitué d'un ensemble de nucléotides qui sont eux même constitués de trois éléments : un groupement phosphate, un sucre, et une base azotée. Il existe quatre bases azotées : l'adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). On représente alors généralement un brin d'ADN par la succession de ces bases azotées (A, T, C, G).

Il existe de plus des règles d'appariement entre les bases azotées : la base A s'apparie uniquement avec la base T, et la base C avec la base G. Ainsi deux brins d'ADN ne pourront se lier pour former la double hélice que si ces brins sont complémentaires, c'est-à-dire si la succession des bases d'un des brins est complémentaire suivant la règle d'appariement A avec T et C avec G du second brin (voir Figure 1.4 b). Cette réaction qui conduit à la formation d'une double hélice s'appelle l'hybridation, et la réaction inverse la dénaturation. Nous utiliserons par la suite le terme "association" pour désigner l'hybridation et "dissociation" pour désigner la dénaturation. Ces deux termes sont en effet plus généraux et pourront s'appliquer à décrire les phases de réaction entre protéines.

Les puces à ADN utilisent cette complémentarité entre deux brins pour l'étape de reconnaissance moléculaire. Lorsqu'un brin d'ADN présent dans l'échantillon à analyser (brin cible) est complémentaire d'un brin d'ADN attaché sur le support de la réaction (sonde de capture), ces deux brins vont pouvoir s'hybrider : c'est ce que nous appelons la "reconnaissance moléculaire".

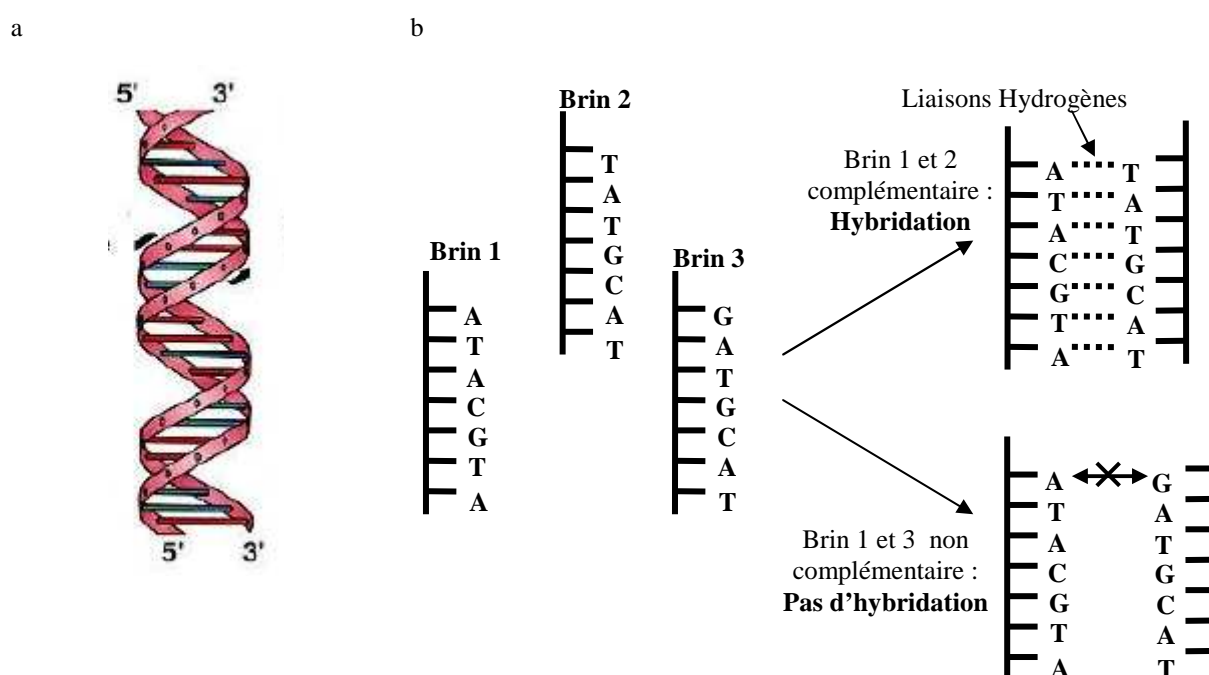


Figure 1.4. a : représentation de la structure en double hélice de l'ADN ; b : Principe de l'hybridation de l'ADN. Trois brins simples constitués chacun d'une succession de nucléotides sont mis en contact. Les brins 1 et 2 sont complémentaires, ils s'associent donc pour former une double hélice. Au contraire les brins 1 et 3 ne sont pas complémentaires, ils ne s'associent donc pas, ou plus exactement la stabilité du duplexe formé est bien plus faible.

Il est ainsi possible par cette reconnaissance moléculaire de détecter la présence de toute entité contenant de l'ADN dans la mesure où il est possible d'extraire cet ADN afin de l'analyser. Cette méthode peut être très spécifique et très sensible (détection possible d'une copie par PCR quantitative).

Cependant, il est impossible de détecter par cette méthode certains agents pathogènes ne possédant pas d'ADN (toxines, protéines, ...). Par ailleurs, afin de détecter la présence d'une bactérie ou d'un virus dans un échantillon par l'utilisation d'une biopuce à ADN, il est nécessaire d'extraire leur ADN avant l'analyse ce qui rajoute une étape et rend plus difficile la détection en continue, contrainte forte de notre cahier des charges. Enfin, cette méthode ne permet pas de vérifier si l'ADN provient d'un organisme vivant (donc pathogène) ou mort (donc non pathogène).

L'utilisation d'anticorps comme sondes de captures

Les anticorps (Ac) constituent un des principaux composants du système immunitaire permettant d'assurer la défense de l'organisme contre l'intrusion de pathogènes. En réponse à un type d'"agresseur", le corps, par l'intermédiaire des lymphocytes, produit un type d'anticorps spécifique à cet agresseur qui a la capacité de le reconnaître et de s'y associer.

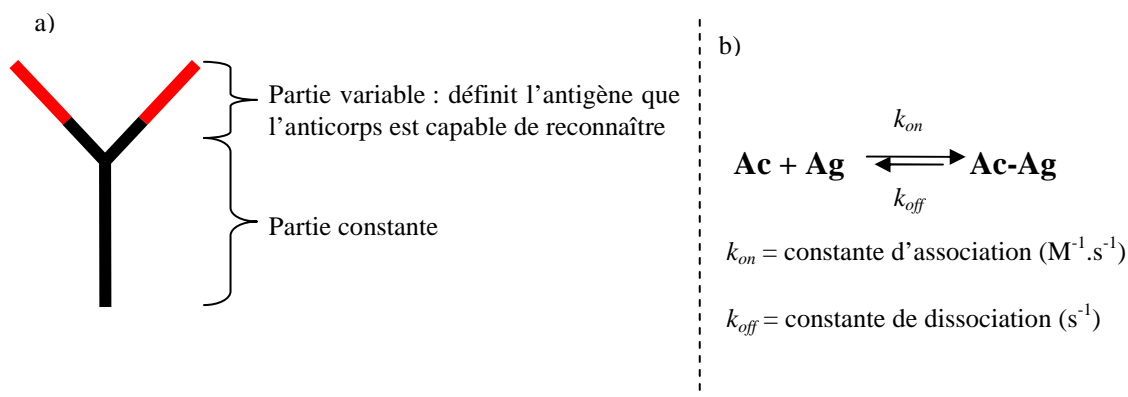


Figure 1.5. a : Structure simplifiée d'un anticorps : il est composé d'une partie variable qui définit l'antigène que l'anticorps est capable de reconnaître, et d'une partie constante à tous les anticorps ; b : réaction de complexation entre un anticorps et son antigène (Ac = anticorps, Ag = antigène, Ac-Ag = complexe anticorps – antigène).

Les anticorps sont des protéines constituées de deux parties, une partie constante et une partie variable qui va déterminer le type de molécules que l'anticorps va reconnaître (voir Figure 1.5 a). Les anticorps possèdent généralement deux sites de liaisons qui se situent au niveau de leurs parties variables.

L'utilisation d'anticorps comme sondes de capture permet de détecter spécifiquement un grand nombre de molécules ne possédant pas forcément d'ADN. Il est ainsi possible de détecter des protéines, des virus et bactéries grâce aux protéines présentes sur leur membrane, ou encore des toxines, ... Les dosages immunologiques présentent donc l'avantage d'être plus génériques que ceux utilisant des biopuces à ADN qui ne peuvent détecter que des cibles possédant de l'ADN.

Affinité et spécificité de la reconnaissance moléculaire

Les deux caractéristiques essentielles du phénomène de reconnaissance moléculaire, que ce soit par des anticorps ou avec de l'ADN, sont l'affinité et la spécificité. L'affinité définit la stabilité du complexe Anticorps – Antigène (Ac – Ag) ou ADN-ADN et la constante d'affinité est donné par le rapport $K_A = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ (en M^{-1}) (voir Figure 1.5 b). Plus l'affinité de l'interaction entre la cible et la sonde de capture est grande et plus le complexe est stable. La spécificité de la sonde de capture correspond, quant à elle, à sa capacité à sélectionner entre des espèces chimiques proches. Idéalement, un anticorps "spécifique" ne pourrait former des complexes stables qu'avec le seul antigène contre lequel il a été produit. De même, un brin d'ADN ne pourrait former de doubles hélices qu'avec son brin complémentaire. Toutefois, il existe toujours des "réactions croisées". Un anticorps peut reconnaître avec des affinités plus ou moins fortes des antigènes analogues, c'est-à-dire de structure plus ou moins semblable à celle de l'antigène de référence. Un brin d'ADN, de son côté, peut former des duplexes plus ou moins stables avec des brins qui ne lui sont pas parfaitement complémentaires mais dont certaines bases varient. On parle dans ce dernier cas de mésappariements (ou mismatch). Cette capacité à pouvoir reconnaître

des cibles avec des affinités différentes a été utilisée pour définir des dosages particuliers permettant une mesure en continu comme nous le verrons dans le paragraphe 1.5.2.2.

La spécificité de détection et les adsorptions non spécifiques

On appellera détection spécifique d'une molécule cible toute réaction de reconnaissance moléculaire entre un analyte et la sonde de capture qui lui est complémentaire. C'est ce type de réaction que les systèmes de détection d'agents pathogènes cherchent à détecter car elles sont spécifiques des molécules cibles recherchées.

Par opposition, toute adsorption de molécules sur le support de la réaction qui n'est pas due à une reconnaissance moléculaire sera qualifiée d'adsorption non spécifique (voir Figure 1.6).

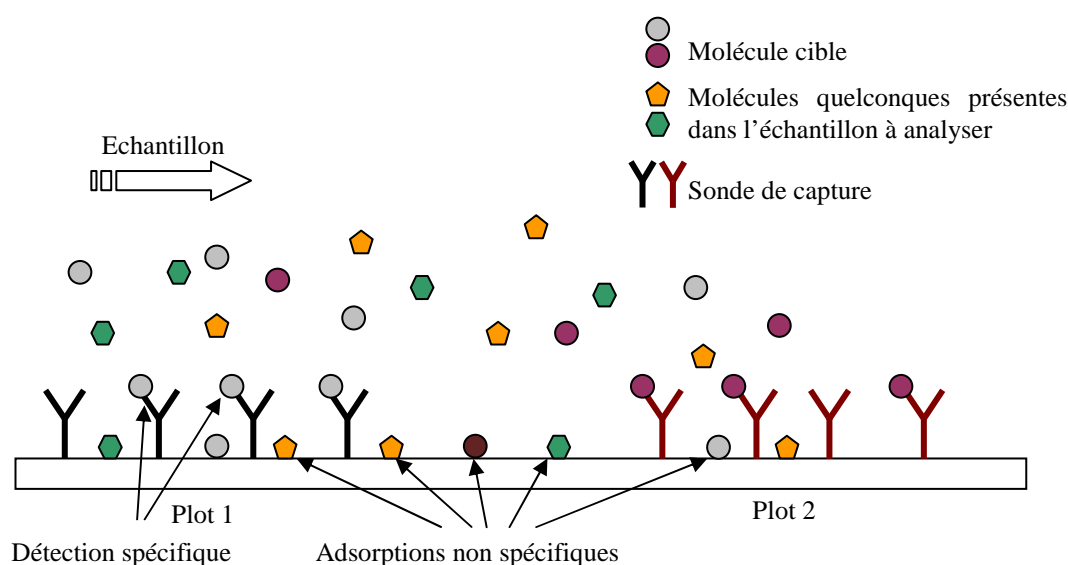


Figure 1.6. Schéma représentatif d'une détection spécifique due à un événement de reconnaissance moléculaire, et d'une adsorption non spécifique des différents composés présents dans l'échantillon à analyser.

Ces adsorptions non spécifiques représentent souvent une importante limitation des systèmes de détection mis au point, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants. En effet, afin d'atteindre les meilleures sensibilités de détection, il est nécessaire de discriminer les signaux dus à des adsorptions non spécifiques des signaux des événements de reconnaissance moléculaire. Pour cela, l'utilisation de traceurs permet généralement d'améliorer la spécificité de détection car le plus souvent leur activité dépend d'un événement de détection spécifique. Cependant, nous verrons que certains traceurs, comme les traceurs magnétiques, peuvent aussi être facilement adsorbés de façon non spécifique sur le support de réaction et créer un signal de fond nuisant à la sensibilité de détection du système.

1.4.3. Transformation du signal biologique en un signal physique mesurable

Une fois cette étape de reconnaissance moléculaire effectuée, il est nécessaire de transformer ces événements de reconnaissance biochimique en signal mesurable dont l'intensité est dépendante de la concentration en analyte : c'est le mécanisme de transduction (voir Figure 1.2). De très nombreux mécanismes de transduction différents ont été utilisés et décrit dans la littérature, que l'on peut séparer en deux catégories : ceux utilisant des traceurs et ceux n'en utilisant pas.

Dans les méthodes utilisant des traceurs, nous pouvons citer :

- la transduction électrochimique, qui repose sur la mesure d'un signal électrique induit ou modifié par la présence de molécules électroactives au voisinage d'une électrode ou d'une surface conductrice. Les traceurs sont alors les molécules électroactives qui peuvent, par exemple, être le produit d'une réaction enzymatique (Turner 1999, Dill 2004). Un autre système utilise des billes d'or comme marqueurs des molécules cibles afin d'autoriser le passage d'un courant électrique entre deux électrodes (Park 2002). Une réaction avec des sels d'argent permet alors d'augmenter le courant électrique mesuré grâce à la croissance d'un film conducteur entre les électrodes.
- la transduction magnétique, qui consiste à utiliser des microparticules magnétiques comme traceurs afin de modifier le champ magnétique au dessus de micro-bobines. Cette méthode permet d'atteindre de très bonnes limites de détection (Sheehan 2005) dans des échantillons pouvant être complexes (sang, urines, salive) (Lu 2006, Meyer 2007).
- la transduction radioactive, qui utilise des particules radioactives. Cette méthode est l'une des plus sensibles et précises. Cependant, la lourdeur des manipulations mises en œuvre, les problèmes de contamination et de réglementation constituent les principaux inconvénients de cette technique et expliquent le désintérêt observé dernièrement pour cette méthode. Elle est par exemple incompatible avec un système portable utilisable hors laboratoire du fait du danger de contamination radioactive de l'environnement.
- la transduction électrochimiluminescente, qui permet d'améliorer la spécificité et la sensibilité de détection des méthodes électrochimiques dans des échantillons complexes, car ces dernières peuvent être gênées par la présence de molécules électroactives non spécifiques dans l'échantillon (Marquette 1999). Cette méthode consiste alors à utiliser un composé chimiluminescent (par exemple le luminol) afin de convertir les composants électroactifs de la réaction enzymatique spécifique de la détection des cibles en un signal optique moins sensible à la composition de l'échantillon.
- la transduction optique, qui utilise des molécules luminescentes. Ces molécules luminescentes peuvent être soit des particules chimioluminescentes ou bioluminescentes, soit des molécules fluorescentes (Lakowicz 1983, Rowe 1999, Ligler 2002, Tschmelak 2005) ou encore des nanoparticules qui diffusent la lumière (Yguerabide 1998, Stimpson 1995). Ces méthodes optiques, et en particulier les méthodes utilisant la fluorescence, sont actuellement les plus performantes en termes de sensibilité et de spécificité de détection et peuvent permettre la détection de molécules individuelles (Unger 1999, Rachet 2007, Castro 2004).

Les méthodes n'utilisant pas de traceurs détectent, quant à elles, directement l'arrivée des molécules sur le support de la réaction. Parmi ces méthodes nous pouvons citer :

- les méthodes par résonance de plasmon de surface (SPR) qui mesurent les variations de l'indice optique au dessus d'une couche métallique (généralement d'or) induites par l'arrivée des molécules cibles (Hoa 2007),
- les méthodes par onde acoustique de surface qui détectent les modifications des propriétés mécaniques d'une surface induites par l'arrivée des cibles sur le support de la réaction,

- les méthodes gravimétriques qui mesurent, à l'aide de microbalances à quartz, les variations de masse induites par l'arrivée des molécules cibles sur le support de la réaction,
- les méthodes à transistors à effets de champs (FET) qui se basent sur la mesure des modifications de la tension aux bornes d'un transistor à effet de champ en fonction de l'arrivée de molécules chargées à sa surface (Jaffrezic-Renault 1999),
- les méthodes basées sur la diffraction de lumière par un réseau optique qui détectent, quant à elles, les variations de l'indice optique du milieu à l'interface du réseau induites par l'arrivée des molécules cibles sur le réseau (Challener 2000),
- les méthodes interférentielles qui détectent les variations de chemin optique sur une figure d'interférence due à la présence ou non de cibles sur un des bras de l'interféromètre utilisé. La plupart de ces méthodes se basent sur un interféromètre de Mach Zender et détectent les variations d'indice sur un des bras dues à l'association des cibles avec les sondes de capture présentes sur le bras (Ingenhoff 1993, Brecht 1995),
- les méthodes à variations d'impédances créées par l'arrivée des molécules cibles entre deux électrodes.

1.4.4. La mesure

Enfin, une fois cette étape de transduction effectuée, il est nécessaire de mesurer ce signal physique afin de remonter à la présence et à la quantité de molécules cibles présentes dans l'échantillon.

Suivant le type de mécanisme de transduction choisi, l'instrument pourra plus ou moins être intégré. En effet, certaines méthodes se basent sur des structures pouvant être réalisées par des techniques de microélectronique (transduction électrochimique, magnétique, par variation de masse, par FET) permettant de profiter des avancées de cette technologie pour leur intégration.

Au contraire, les méthodes de transduction optique nécessitent généralement des instrumentations volumineuses et complexes. En effet, il est nécessaire de diriger la lumière vers le détecteur optique ce qui peut demander des composants volumineux et fragiles, très sensibles aux problèmes d'alignement ou de focalisation lorsque un système imageur est requis (Rowe 1999, Golden 2005, Taitt 2005).

Cependant, de nouvelles réalisations ont montré la possibilité de contourner ces problèmes en intégrant la détection dans le composant (Vo-Dinh 1999, Naimushin 2002, Chediak 2004, Choudury 2004, Misiakos 2004), ou en limitant les composants optiques avant le détecteur (Robinson 1993, Schultz 2007). Ces travaux démontrent ainsi la possibilité d'intégration des systèmes basés sur une détection optique sans en réduire les performances.

1.5. La transduction du signal

Nous allons à présent détailler les méthodes de transduction du signal présentées précédemment en précisant les méthodes compatibles avec le cahier des charges que nous nous sommes fixé.

Pour ce faire, une distinction entre les méthodes utilisant des traceurs et celles n'en utilisant pas sera effectuée. De plus, nous séparerons les méthodes utilisant des traceurs en deux sous catégories : les méthodes avec marqueurs et les méthodes sans marqueur.

Les méthodes sans traceur détectent directement l'arrivée de molécules sur le support de la réaction alors que les méthodes avec traceurs utilisent des molécules intermédiaires (billes magnétiques, enzymes, fluorophores, ...) afin de suivre un événement de reconnaissance moléculaire. On distinguera de plus les termes traceurs et marqueurs qui désignent respectivement les molécules permettant de suivre indirectement les réactions de reconnaissance moléculaire et les molécules que l'on attache directement sur la cible afin de détecter leur présence dans un échantillon. Les marqueurs correspondent donc à une utilisation particulière des traceurs dans le sens où ils sont attachés aux molécules cibles.

Nous montrerons ainsi que les méthodes sans traceur ne sont pas adaptées au cahier des charges que nous nous sommes fixé en particulier à cause de problèmes de spécificité de détection. Puis l'étude des différentes méthodes avec traceurs nous permettra de montrer que l'utilisation de marqueurs sur les molécules cibles est incompatible avec une détection en continu, contrainte importante de notre application.

1.5.1. Méthodes sans traceurs

Afin de bien comprendre le principe des mécanismes utilisés dans ces méthodes de transduction du signal sans traceurs qui détectent directement l'arrivée des molécules cibles sur le support de la réaction, nous allons présenter le principe des systèmes à variation de masse. Cela nous permettra de faire ressortir les avantages et limites de cette méthode, et de les comparer aux contraintes que nous nous sommes fixées. Une rapide présentation de la méthode optique par plasmon de surface sera ensuite effectuée, ce qui permettra de généraliser les remarques effectuées sur les systèmes précédents à l'ensemble des mécanismes de transduction sans traceur.

Méthode de transduction par variation de masses.

Cette méthode est basée sur la détection des variations de masse induites par l'arrivée des molécules cibles sur le support de la réaction (Davila 2007). Pour cela, le support de la réaction est réalisé soit sur une micro pointe, appelé cantilever, soit sur une microbalance à quartz. La mesure des variations de masse à leur surface est alors effectuée en mesurant les variations des résonances mécaniques du cantilever ou de la balance à quartz. En effet, la fréquence de résonance de ces composants dépend de leur masse et donc de la masse adsorbée à leur surface. Ainsi, si on greffe sur ces supports des sondes de capture des molécules que l'on veut détecter, chaque événement de reconnaissance moléculaire va induire une variation de masse due à l'association de la cible avec sa sonde de capture (voir Figure 1.7).

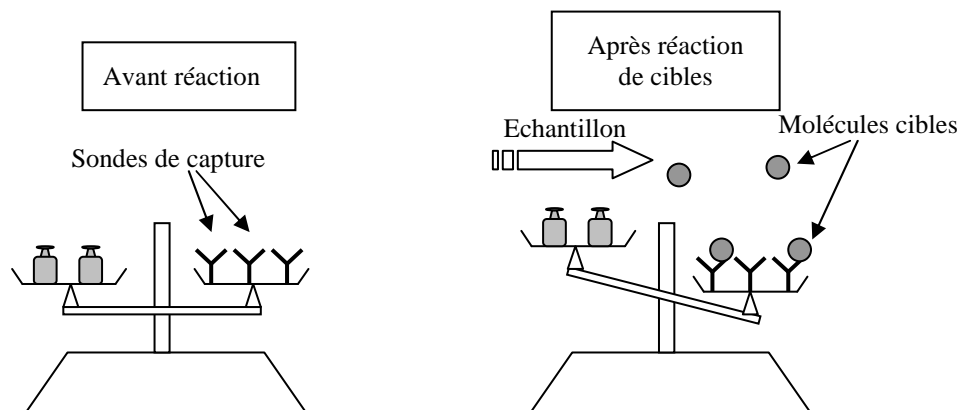


Figure 1.7. Représentation schématique du principe de mesure d'un système de transduction par variation de masse. Après réaction, l'association des cibles avec les molécules sondes entraîne une augmentation de masse sur la zone de mesure. Cette variation de masse peut alors être détectée en mesurant par exemple le décalage de la fréquence de résonance du capteur.

Aucune étape de marquage des molécules cibles ou de lavage de l'échantillon n'est alors obligatoire pour détecter la présence de molécules sur le support de réaction. De plus, seules les molécules qui sont à la surface du support de la réaction sont détectées et pas les molécules présentes dans le volume de l'échantillon. Ces techniques permettent donc d'effectuer des mesures en continu de l'échantillon, contrainte que nous nous sommes fixée.

Cependant, cette méthode de mesure est incapable de différencier l'association des molécules cibles par les sondes de capture de l'adsorption non spécifique d'autres molécules sur le support de la réaction (voir Figure 1.6). Ce type de méthode sans traceur présente donc en général des spécificités de détection moyennes ce qui constitue leur principale limitation vis-à-vis de notre cahier des charges.

Méthode de transduction par plasmon de surface (SPR)

Cette méthode de détection consiste à exciter le plasmon de surface d'une couche métallique déposée sur le support de la réaction biologique et à mesurer les déplacements de la résonance de ce plasmon. L'excitation du plasmon de surface a lieu lorsqu'une onde lumineuse se propageant dans un milieu d'indice de réfraction élevé est réfléchi par un milieu métallique (le plus souvent une couche mince d'or). Le champ de l'onde lumineuse a alors la possibilité d'exciter les électrons libres présents dans la couche métallique créant une onde d'électrons : le plasmon de surface. Pour une incidence particulière, le faisceau lumineux entre en résonance avec le plasmon de surface. Toute l'énergie de cette onde est convertie en plasmon et il n'y a alors plus d'onde transmise ni réfléchi. Cet angle d'incidence pour lequel la résonance se produit dépend des propriétés de la couche métallique, de la longueur d'onde de la lumière incidente et des indices optiques des milieux entourant la couche métallique. Ainsi, si le milieu change, l'angle de résonance change aussi, ce qui constitue le principe le plus courant de la mesure en SPR. En effet, la fixation de molécules sur la surface de la couche métallique entraîne une modification de l'indice optique du milieu et donc un déplacement de l'angle de résonance de plasmon (voir Figure 1.8). Cette méthode détecte donc les modifications globales de l'indice optique des milieux au voisinage immédiat (< 100 nm) de la couche métallique.

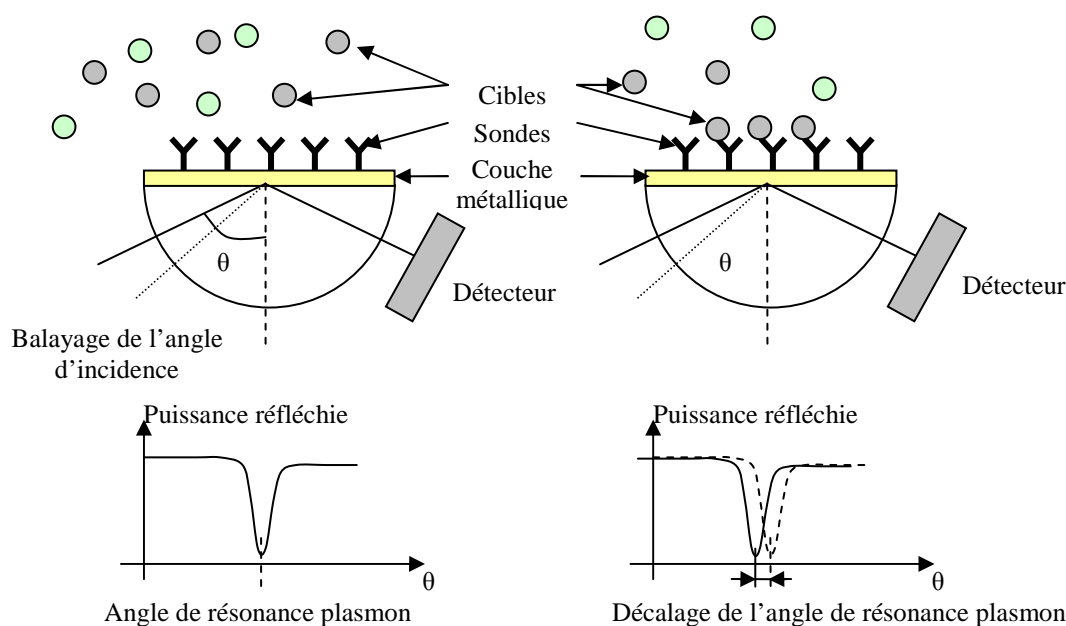


Figure 1.8. Schéma de principe de la détection par la résonance de plasmon de surface. La reconnaissance entre une molécule sonde et une cible modifie l'indice de réfraction du milieu juste au dessus de la couche métallique et donc modifie l'angle de résonance plasmon (illustration reprise du livre Roncali 2007).

Ce type de transduction, ainsi que les méthodes par onde acoustique de surface, par FET ou basées sur la diffraction d'un faisceau lumineux, qui détectent directement l'arrivée de molécules sur la surface de la réaction, sont donc compatibles avec une mesure en continu. Cependant, elles ne permettent pas de discriminer les événements de reconnaissance moléculaire des adsorptions non spécifiques de molécules présentes dans l'échantillon ce qui peut fortement limiter leur sensibilité. La solution la plus fréquemment utilisée est de placer, sur la puce, des plots témoins. Ces plots ne comportent pas de sondes de captures et doivent, théoriquement du moins, permettre la mesure des adsorptions non spécifiques. Cependant, les problèmes liés aux adsorptions non spécifiques sont très complexes et ne peuvent être traités simplement via des plots témoins. De plus, ces adsorptions élèvent le niveau du signal mesuré donc l'amplitude du bruit de mesure et l'emploi d'un plot témoin fait intervenir, dans l'expression du signal spécifique, une mesure supplémentaire : la sensibilité est donc dégradée.

Enfin, une fois les cibles capturées sur le support de la réaction, il est très difficile de les retirer (désorption) : la régénération du dispositif en vue d'une nouvelle détection est alors très difficile. Le support de la réaction est donc à usage unique, ce qui limite l'autonomie du dispositif pour des applications sur de longues périodes.

L'ensemble des méthodes de transduction du signal sans traceur présentent donc le problème d'adsorption non spécifique ce qui nuit à leurs performances en termes de spécificité et de sensibilité de détection. L'utilisation de traceurs peut permettre de limiter les effets de telles adsorptions grâce à la spécificité du traceur, c'est-à-dire sa capacité à émettre un signal seulement lorsqu'il est témoin d'un événement de reconnaissance moléculaire ou directement attaché à une molécule cible (cas des marqueurs).

1.5.2. Méthodes avec traceurs

Étudions à présent les méthodes avec traceurs, c'est-à-dire les méthodes utilisant des molécules particulières

(fluorophores, microparticules magnétiques, enzymes, ...) permettant la détection et le dosage de produits.

Pour ce faire, nous allons distinguer les méthodes utilisant des traceurs pour marquer les molécules cibles (que nous nommerons les méthodes avec marqueurs) de celles qui détectent indirectement la présence des cibles grâce à des protocoles biologiques particuliers (que nous nommerons les méthodes sans marqueur).

1.5.2.1. Méthodes avec marqueurs

Le principe des méthodes avec marqueurs est de signaler les molécules cibles avant, pendant ou après la réaction de reconnaissance moléculaire à l'aide de molécules que l'on est capable de détecter : molécules magnétiques, fluorophores, enzymes transformant un produit, ...

Pour cela, le protocole classiquement utilisé en immunoanalyse est la méthode dite « en sandwich ». Ce protocole consiste à (voir Figure 1.9) :

- i. faire réagir les molécules cibles avec le support de réaction sur lequel les anticorps de capture ont été accrochés,
- ii. faire circuler au dessus du support de la réaction une solution comportant des anticorps de détection préalablement marqués à l'aide d'un traceur. Ces anticorps vont à nouveau reconnaître les cibles capturées lors de la phase (i) et s'y associer.
- iii. laver le support de réaction afin d'éliminer le surplus d'anticorps de détection marqués qui sont présents dans l'échantillon. Certaines méthodes de transduction peuvent cependant permettre de s'affranchir de cette étape grâce à une restriction du volume de mesure au niveau de la surface de réaction (ondes évanescentes, SPR, ...). Les traceurs présents dans l'échantillon ne contribuent alors plus au signal et dans ce cas les étapes de marquage (ii) et de mesure (iv) peuvent être réalisées simultanément.
- iv. mesurer le signal des traceurs utilisés afin de remonter à la présence et à la concentration des molécules cibles dans l'échantillon.

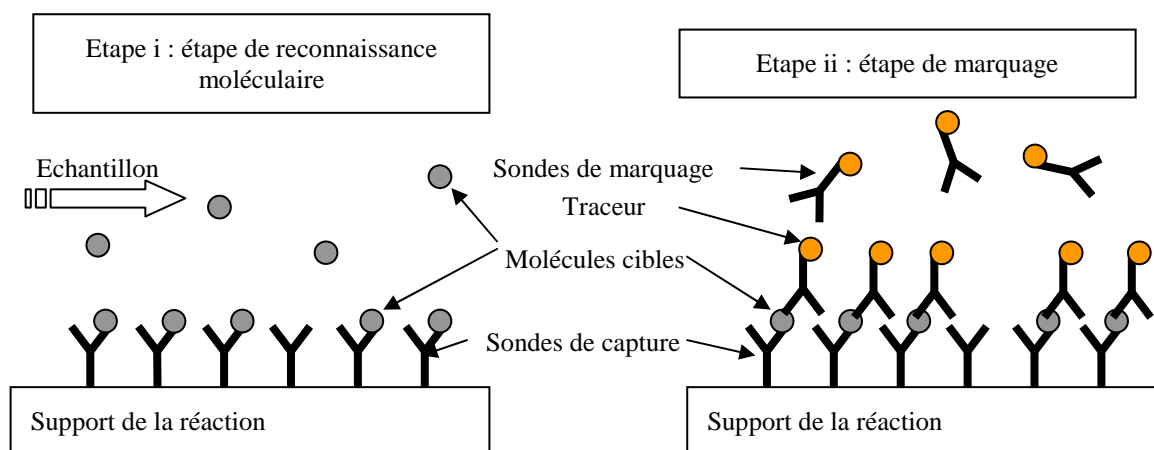


Figure 1.9. Principe de la réaction « en sandwich ». La détection des événements de reconnaissance moléculaire se fait par le marquage des molécules cibles à l'aide d'une sonde de marquage sur laquelle est fixé un traceur.

Ce protocole de réaction peut également être applicable avec de l'ADN bien qu'il soit plus courant de réaliser le marquage des cibles pendant l'amplification en utilisant des amorces fluorescentes.

Cette méthode offre l'avantage d'être très sensible (Sapsford 2002) et spécifique car nous avons un double étage de reconnaissance moléculaire : par les anticorps greffés sur le support de la réaction (sondes de capture), et par les anticorps de détection (sonde de marquage).

Cependant, il est difficile de détecter de petites molécules (< 800 Da) par cette méthode (Ligler 2003) car les molécules cibles doivent posséder au moins deux sites d'accroche (épitopes). En effet, cette méthode implique la fixation de deux sondes (des anticorps sur la Figure 1.9) sur la molécule cible pour sa détection : la sonde de capture, et la sonde de marquage.

Par ailleurs, cette méthode n'est pas bien adaptée à des mesures en continu. En effet, une utilisation en continu impliquerait que la réaction de reconnaissance moléculaire se fasse en présence de la solution de marquage. On aurait alors un signal de fond très important dû à la présence des sondes de marquage dans l'échantillon ce qui nuirait à la sensibilité de détection. Cette méthode est donc généralement utilisée en point final, c'est-à-dire après réaction des cibles avec les sondes de capture et lavage des sondes de marquage en excédent dans l'échantillon.

Certains mécanismes de transduction permettent toutefois d'effectuer les étapes de marquages et de mesure simultanément, autorisant ainsi une mesure en continu. Ces méthodes sont basées sur un confinement de la zone de mesure au niveau du support de la réaction afin de s'affranchir des signaux des sondes de marquage présentes dans le volume de l'échantillon. On peut, par exemple, citer les méthodes d'excitation par ondes évanescentes (Rowe 1999, Sapsford 2002, Tschmelak 2005), ou encore les méthodes locales de transduction (SPR avec traceurs, SAW avec traceurs, ...). Cependant, ces méthodes de transduction ne permettent pas de s'affranchir de l'adsorption non spécifique des anticorps marqués sur le support de la réaction créant un signal ne correspondant pas à la détection d'une cible. Cette adsorption des sondes de détection est d'autant plus gênante que la quantité d'anticorps marqués et mélangés à l'échantillon est importante (forte concentration pour accélérer l'étape de marquage).

De plus, ce protocole de mesure implique l'utilisation d'une quantité très importante d'anticorps de marquage, ce qui peut le rendre très coûteux et difficile à mettre en place en pratique (volume important de réactifs, utilisation de moyens de conservation).

Enfin, ces méthodes n'autorisent toujours pas la régénération du support de la réaction permettant de pouvoir réaliser plusieurs fois une même réaction sur le même support. En effet, un complexe sonde de capture – cible est très difficile à dissocier une fois formé, ce qui rend les supports de ces protocoles à usage unique. Cela nuit alors fortement à l'autonomie du système.

Bien qu'elles permettent d'améliorer la sensibilité et la spécificité de détection, les méthodes de transduction du signal avec marquage des molécules cibles à l'aide de traceurs ne sont donc pas adaptées à notre cahier des charges, en particulier pour des analyses de surveillance en continu.

1.5.2.2. Méthodes sans marqueurs

Considérons à présent une famille de méthodes permettant la détection indirecte des événements de reconnaissance moléculaire à l'aide de traceurs. Ces méthodes utilisent les différences d'affinité que peuvent avoir les anticorps pour les cibles et des analogues des cibles qui sont des molécules proches chimiquement (idéalement, analogues des épitopes reconnus par les anticorps).

Le protocole de dosage biologique avec traceurs le plus adapté à la surveillance en continu est le dosage que nous appelons "ASDI" (Antibody Surface Displacement Immunoassay) qui consiste à (voir Figure 1.10) :

- i. greffer sur le support de la réaction des analogues des molécules cibles que l'on désire détecter,
- ii. faire réagir ces analogues avec les anticorps de capture préalablement marqués par un traceur,
- iii. faire circuler l'échantillon au-dessus de la surface de réaction. Lorsque des cibles sont présentes dans l'échantillon, les anticorps, qui possèdent une affinité supérieure pour les cibles que pour les analogues, vont préférentiellement s'associer aux molécules cibles et se détachent des analogues présents sur le support de la réaction. Ce processus est appelé "compétition" entre les analogues et les cibles à détecter. Le signal des traceurs au niveau du support de la réaction décroît alors de façon corrélée à la quantité de cibles présentes dans l'échantillon.

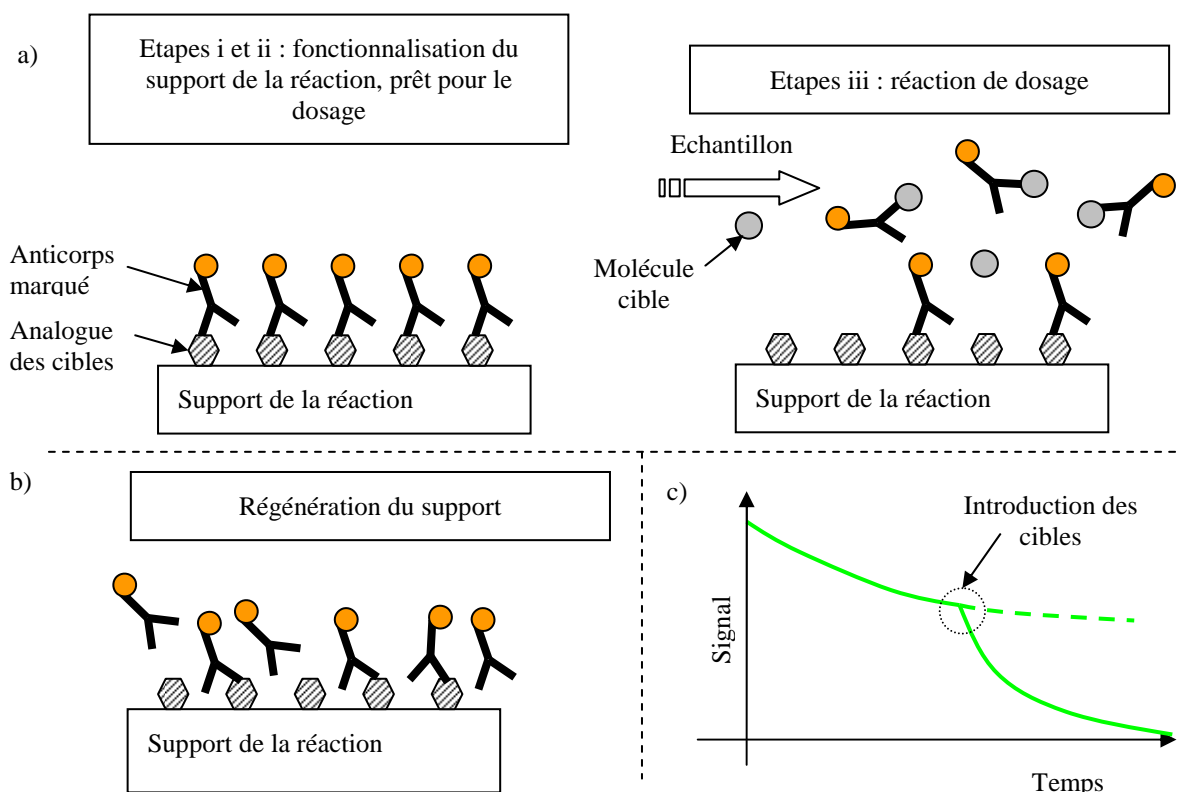


Figure 1.10. a : principe de la réaction ASDI. Les anticorps marqués et fixés aux analogues greffés sur le support de la réaction vont préférentiellement s'accrocher aux molécules cibles lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon, induisant une baisse de signal des traceurs au niveau du plot biologique. b : principe de la régénération du support de la réaction : il suffit de faire circuler sur le support des anticorps marqués qui vont à nouveau se fixer aux analogues greffés sur le support de la réaction. c : signal typique d'une réaction de dosage par cette méthode. La pente avant introduction des cibles dans l'échantillon est due à la dissociation naturelle anticorps-analogues.

Cette méthode présente plusieurs avantages :

- elle ne nécessite pas le marquage direct des cibles, simplifiant ainsi la préparation de la réaction,
- elle fonctionne pour toutes tailles de molécules, même petites, sous réserve de disposer des analogues des molécules que l'on veut détecter,
- elle n'emploie pas une quantité trop importante de matériel biologique (anticorps, analogues). De plus les analogues, qui peuvent aussi présenter un caractère pathogène, ne sont pas relâchés dans

l'échantillon évitant ainsi une pollution accidentelle du milieu analysé,

- cette méthode permet une régénération du support de la réaction, ce qui est un avantage important pour l'autonomie de fonctionnement de l'instrument (Sapsford 2002),
- elle permet d'effectuer des dosages en continu (Sapsford 2002),
- enfin, cette méthode permet d'avoir une bonne spécificité de détection du fait de l'emploi de traceurs spécifiques. En effet, une molécule quelconque adsorbée sur le support de la réaction ne modifie pas significativement le signal, seules les molécules cibles qui entraînent un déplacement des anticorps de la surface permettent de le faire varier. Nous pouvons cependant avoir des adsorptions non spécifiques d'anticorps marqués qui se sont dissociés de leur analogue sans la présence de cibles, ce qui peut nuire à la sensibilité du système. Nous verrons qu'il est possible de limiter la contribution de ces adsorptions grâce au phénomène de FRET.

Cette méthode convient donc aux différentes contraintes que nous nous sommes fixées pour la réalisation d'un instrument de détection d'agents pathogènes hors laboratoire.

Par ailleurs, on note que la sensibilité de ce type de détection peut être améliorée grâce à l'emploi d'un protocole biologique utilisant un mécanisme de transfert d'énergie (FRET) (Neuburger 2006), ce que nous verrons dans le paragraphe 1.6.2.3.

1.6. Comparaison des différents traceurs utilisables dans une méthode ASDI

La méthode ASDI étant bien adaptée aux contraintes fixées par notre cahier des charges, nous allons à présent comparer différents traceurs utilisables dans ce protocole afin de déterminer la solution la plus efficace pour notre dispositif.

Nous allons montrer dans un premier temps les limites des méthodes utilisant des traceurs non fluorescents (magnétiques, radioactifs, enzymes, ...) principalement en termes de non spécificité de réponse. Nous présenterons ensuite le phénomène de fluorescence et détaillerons pourquoi les fluorophores sont les candidats les plus adaptés à notre problématique.

1.6.1. Techniques utilisant des traceurs non fluorescents

Il existe différents types de traceurs non fluorescents utilisés comme moyen de transduction du signal. On peut citer les traceurs magnétiques, électrochimiques, chimio ou bioluminescents ou encore les traceurs radioactifs.

Traceurs magnétiques

Les méthodes de transduction utilisant des traceurs magnétiques sont généralement très sensibles (Sheehan 2005) et permettent la détection de cibles dans des échantillons pouvant être complexes (sang, urines, salive) (Lu 2006, Meyer 2007). En effet, les propriétés magnétiques de ces microparticules sont très peu influencées par la composition de l'échantillon et les signaux magnétiques naturels des échantillons testés sont négligeables : seules les microparticules magnétiques peuvent être détectées par les bobines constituant les détecteurs.

Cependant, la surface importante de ces particules fait qu'elles peuvent être facilement adsorbées sur le support

de la réaction créant des signaux non spécifiques (voir Figure 1.11) limitant la sensibilité du système. En effet, il devient impossible de discriminer les particules magnétiques adsorbées non spécifiquement sur la surface des particules magnétiques correspondant à un événement de reconnaissance moléculaire.

Pour minimiser ce signal non spécifique, une équipe du Naval Research Laboratory propose d'effectuer un lavage spécial de la surface de réaction afin d'éliminer le maximum de traceurs adsorbés et donc d'améliorer la spécificité de détection de leur système (Mulvaney 2007, voir Figure 1.11).

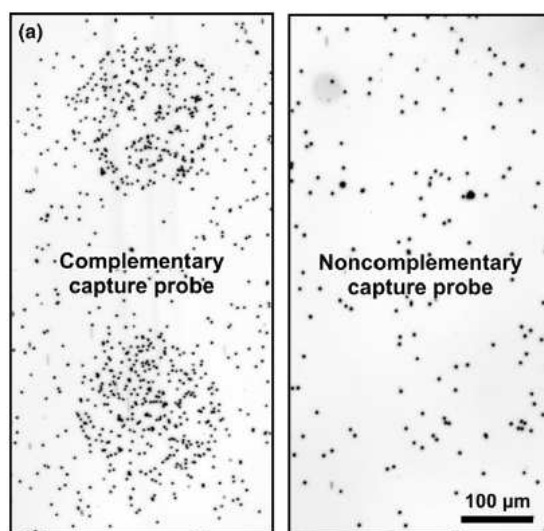


Figure 1.11. Microphotographie du substrat de réaction d'une méthode de transduction par traceurs magnétiques pour une zone de détection contenant les sondes de capture complémentaires des cibles que l'on veut détecter (photo de droite) et une zone de détection où les sondes de capture ne sont pas complémentaires des cibles : zone non spécifique de référence (photo de gauche). On observe qu'une quantité non négligeable de particules magnétiques (points noir) ont été adsorbées sur le substrat de la réaction, entraînant un signal de fond non spécifique important nuisant à la sensibilité du système (d'après Mulvaney 2007).

On perd cependant dans ce cas la possibilité d'effectuer des mesures en continu, qui est une contrainte importante de notre cahier des charges.

Ce type de traceurs n'est donc pas adapté pour la réalisation de notre instrument, du fait soit de leur faible spécificité, soit de l'incompatibilité avec une mesure en continu.

Autres traceurs non fluorescents

Cette remarque de non spécificité de détection due à l'adsorption non contrôlée de traceurs sur la surface de réaction peut être appliquée à d'autres types de traceurs comme les enzymes. De plus, les enzymes nécessitent une étape de révélation ce qui est incompatible avec une mesure en continu.

Certaines équipes ont, par ailleurs, cherché à combiner les avantages des méthodes de transduction sans traceur (par plasmon de surface, par onde acoustique de surface) avec un dosage « en sandwich » afin d'améliorer la sensibilité de détection de leur système (Naimushin 2002). Ces méthodes permettent alors d'obtenir des limites de détection très basses mais ne permettent pas de s'affranchir des adsorptions non spécifiques des traceurs et sondes de marquages sur le support de la réaction limitant ainsi leur spécificité et leur sensibilité de détection. De plus, elles ne sont pas compatibles avec une mesure en continu.

Nous avons donc choisi de ne pas utiliser ce type de traceurs et de méthode de transduction car la spécificité de

détection et la mesure en continu sont des paramètres prépondérants pour la mise au point de notre système de détection d'agents pathogènes.

1.6.2. La fluorescence

Nous avons montré que l'utilisation de traceurs permettait, dans la plupart des cas, d'améliorer la spécificité de détection et qu'une méthode sans marqueurs permettait en plus de suivre la réaction en continu. Par contre, l'adsorption non spécifique des traceurs non fluorescents limite les performances de la réaction biologique en termes de sensibilité de détection. Des traceurs plus spécifiques sont donc nécessaires afin de minimiser ces signaux parasites.

Nous allons à présent nous attacher à démontrer que la fluorescence est la solution la mieux adaptée pour répondre à l'ensemble des contraintes que nous nous sommes fixées pour la réalisation de notre système d'analyse. Dans un premier temps, un rappel des principes généraux de la fluorescence sera effectué. Puis nous montrerons que l'utilisation de la fluorescence avec le protocole de réaction ASDI (voir paragraphe 1.5.2.2) permet de satisfaire à l'ensemble des contraintes que nous nous sommes fixées. Enfin, la méthode SPIT-FRI qui doit permettre d'atteindre un niveau de spécificité du signal optique encore plus grand et une sensibilité de détection meilleure sera introduite.

1.6.2.1. Généralités sur la fluorescence

La luminescence

La fluorescence fait partie des phénomènes de luminescence qui regroupent l'ensemble des phénomènes d'émission de lumière par une molécule située dans son état excité. Les différents types de luminescence sont définis à partir du moyen utilisé pour exciter la molécule. En effet, il existe plusieurs façons d'exciter une molécule luminescente :

- par **électroluminescence** : l'énergie portée par un champ électrique permet d'exciter la molécule luminescente qui ensuite est capable d'émettre un photon. Ce phénomène sera décrit ultérieurement lors de la présentation des sources de type OLED (Organic Luminescent Electrical Device) car il constitue la base de leur fonctionnement,
- par **photoluminescence** : l'énergie portée par un champ électromagnétique est absorbée par la molécule luminescente provoquant son passage dans un état excité. Sa relaxation vers son état fondamental se fait ensuite par l'émission d'un photon. Ce phénomène regroupe la fluorescence et la phosphorescence qui se distinguent par les temps caractéristiques d'émission du photon,
- par **chimiluminescence** : le passage de l'état fondamental à un niveau excité se fait grâce à une réaction chimique, et le retour à l'état fondamental entraîne l'émission d'un photon,
- par **bioluminescence** : qui correspond à l'émission de lumière par un organisme vivant résultant d'une réaction chimique au cours de laquelle l'énergie chimique est convertie en énergie lumineuse.

Dans la suite de la thèse, nous nous intéresserons uniquement aux phénomènes de photoluminescence et d'électroluminescence.

La fluorescence

Le principe de la photoluminescence repose sur l'absorption d'un photon d'énergie E_a et la réémission d'un photon d'énergie inférieure E_e par une molécule. Le diagramme de Perrin-Jablonski (Lakowicz 1983), représenté sur la Figure 1.12, permet d'illustrer le principe de la fluorescence ainsi que les différents phénomènes annexes mis en jeu.

A partir de ce diagramme, deux types de phénomènes de photoluminescence peuvent être définis :

- la fluorescence qui est un phénomène rapide. Elle met en jeu des transitions entre deux états singulets et la durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-7} s,
- la phosphorescence qui est un phénomène plus long et peut se produire après l'arrêt du signal d'excitation (ex : écran cathodique). Ce phénomène met en jeu des transitions interdites entre un état triplet et un état singulet et dont la durée de vie moyenne de l'état excité est de l'ordre de 10^{-5} s à 1 s. La probabilité de phosphorescence est au moins un ordre de grandeur plus faible que la probabilité de fluorescence car elle implique une transition interdite entre deux états de multiplicités différentes.

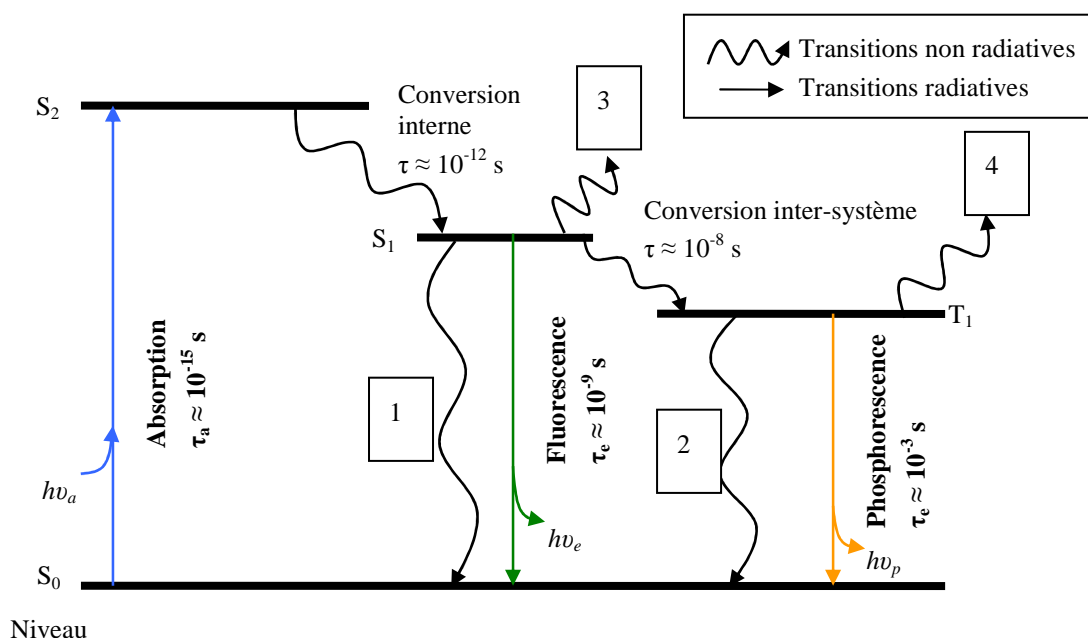


Figure 1.12. Diagramme de Jablonski. Les niveaux S_0 , S_1 et S_2 sont des états singulets, le niveau T_1 est triplet. Les transitions non radiatives 3 et 4 représentent des transformations photochimiques de la molécule vers un autre état fondamental que l'état S_0 . Les temps caractéristiques évoqués sont des ordres de grandeur qui peuvent varier fortement d'un fluorophore à l'autre.

Chaque molécule fluorescente, ou fluorophore, est caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres. Ces spectres sont caractéristiques de la structure électronique de la molécule. Les conversions internes et inter-système (voir Figure 1.12), qui sont des pertes d'énergie sous forme de chaleur ou par vibration, impliquent que seule une partie de l'énergie absorbée peut être réémise sous forme d'un photon. Ainsi, la longueur d'onde du maximum d'émission est supérieure, c'est-à-dire moins énergétique, que la longueur d'onde du maximum d'excitation : ce décalage est appelé « décalage de Stokes ».

Les propriétés des fluorophores varient également en fonction de l'environnement. Elles sont notamment dépendantes de la température, du solvant (polarité, pH, ...), de la concentration en fluorophores. Par ailleurs,

différents phénomènes moléculaires peuvent interférer avec le processus d'absorption et d'émission de photons et conduire à une extinction de la fluorescence. Ces phénomènes sont représentés par les transitions non radiatives 1, 2, 3 et 4 de la Figure 1.12 et correspondent soit à des pertes d'énergie sous forme de chaleur (transitions 1 et 2) soit à une modification chimique du fluorophore affectant ses propriétés optiques (transitions 3 et 4)

Les phénomènes d'extinction de la fluorescence

L'extinction de fluorescence comprend au sens large tout phénomène diminuant l'intensité de fluorescence. Mis à part les effets optiques (ex : réabsorption, turbidité de la solution) qui ne sont pas des phénomènes à l'échelle moléculaire, cette diminution de l'intensité de fluorescence peut avoir diverses origines donnant lieu à une extinction irréversible ou réversible de la fluorescence. Dans ce dernier cas, nous parlerons de « quenching » de la fluorescence.

Le photoblanchiment est un phénomène irréversible de photodestruction des molécules qui a lieu à l'état excité, conduisant à une modification de la structure chimique et électronique du fluorophore. Les molécules photoblanchies ne peuvent plus être excitées et donc ne peuvent plus émettre de photon.

Ce phénomène résulte d'une réaction chimique mettant en jeu le marqueur fluorescent dans son état excité. Pour une excitation en continu, il est possible de considérer que ce phénomène résulte du fait que le nombre de cycles d'excitation et de relaxation pour un fluorophore est limité : à partir d'un certain nombre de cycles, la molécule peut se dénaturer et perdre ses propriétés de fluorescence. Ce blanchiment dépend des conditions d'éclairement (longueur d'onde et puissance) et de l'environnement du fluorophore (présence de molécules d'oxygène par exemple), et chaque fluorophore présente une sensibilité propre au photoblanchiment selon sa structure et son environnement.

Ce phénomène peut être une contrainte importante pour les systèmes de détection basés sur la fluorescence car le flux de photons pouvant être émis par les fluorophores est limité. Il peut cependant être utilisé pour des mesures de caractérisation comme la technique de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) qui consiste à détruire la fluorescence d'une zone de l'échantillon et à mesurer la régénération du signal fluorescent dans cette zone. Cette technique permet par exemple d'étudier la diffusion des molécules fluorescentes dans le milieu sondé (Axelrod 1976, Reits 2001) car la régénération du signal fluorescent dans la zone photoblanchie provient de la diffusion de molécules fluorescentes dans cette zone.

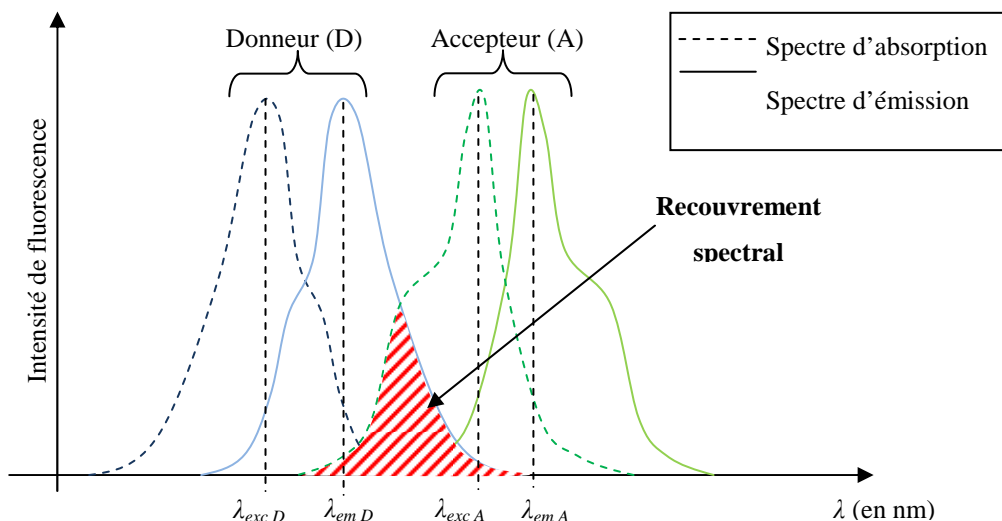
Il existe d'autre part des phénomènes d'extinction de la fluorescence réversibles que nous appellerons « quenching ». Le quenching peut avoir diverses origines (Lakowicz 1983) :

- le « *quenching statique* » : il résulte de la formation d'un complexe entre la molécule fluorescente et une autre molécule que l'on nommera "*quencher*". La présence du quencher modifie alors les propriétés électroniques de la molécule fluorescente, ce qui implique un changement des propriétés de fluorescence de cette dernière,
- le « *quenching dynamique* » : il résulte d'un transfert d'énergie entre le fluorophore et le quencher ou le milieu suite à une collision entre ces deux particules. Ce type de quenching dépend donc fortement de la mobilité des molécules mise en jeu (diffusion, température, ...). Il est cependant très difficile à estimer et à contrôler et constitue généralement une limitation pour nos mesures,

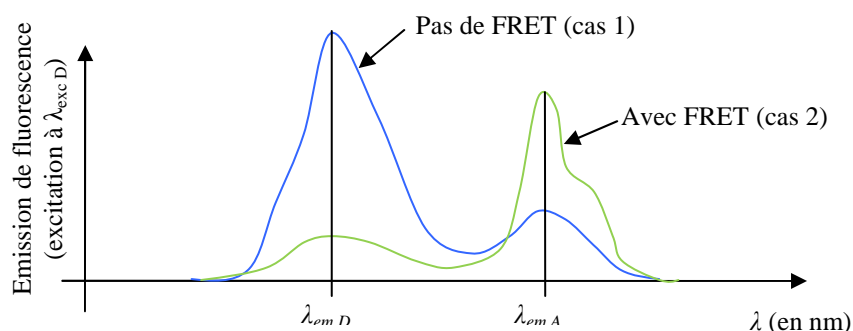
- le FRET (pour *Förster* ou *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) : il correspond à un phénomène de transfert d'énergie de fluorescence impliquant le fluorophore appelé Donneur (D), et une autre molécule appelée Accepteur (A) pouvant aussi être un fluorophore (voir Figure 1.13 dans le cas d'un accepteur fluorescent). Ce phénomène se produit lorsque plusieurs conditions particulières sont réunies, à savoir lorsque (i) les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se recouvrent, (ii) les deux molécules D et A se trouvent proches l'une de l'autre (pour une distance inférieure à 100 Å), et (iii) leurs dipôles de transition électronique sont alignés. On observe alors une diminution de la fluorescence du donneur qui, dans le cas d'un accepteur fluorescent, peut s'accompagner d'une augmentation de la fluorescence de l'accepteur. Ce transfert d'énergie entre le donneur et l'accepteur ne se fait pas par l'intermédiaire d'un photon mais sous la forme d'une interaction dipôle-dipôle (car les fluorophores sont apparentés à des dipôles. Cependant, il existe des transferts du même type entre molécules multipolaires), c'est-à-dire lorsque les dipôles électroniques du donneur et de l'accepteur rentrent en résonance. Ce transfert d'énergie décroît en $1/r^6$, r étant la distance entre le donneur et l'accepteur. Ce phénomène est donc très intéressant pour l'étude de processus à l'échelle moléculaire car c'est une interaction en champ proche très fortement dépendante de la distance r d'interaction entre le donneur et l'accepteur,
- enfin, il peut aussi y avoir un transfert radiatif entre deux fluorophores, le deuxième absorbant un photon émis par le premier. Cependant, au vu des densités de fluorophores utilisées et des distances entre ces derniers, ce phénomène est marginal dans les biocapteurs à fluorescence.

Ces phénomènes d'extinction de la fluorescence peuvent aussi bien être une limitation dans les mesures basées sur la fluorescence qu'un moyen pour la mise au point de méthodes d'analyse particulières. Par exemple le photobleaching est utilisé dans la technique de FRAP (Axelrod 1976, Reits 2001), et le FRET pour l'étude de phénomènes à l'échelle moléculaire (Fung 1978) ou bien la mise au point de nouvelles techniques de dosages (Tran 2003, Cardullo 1988).

(a)

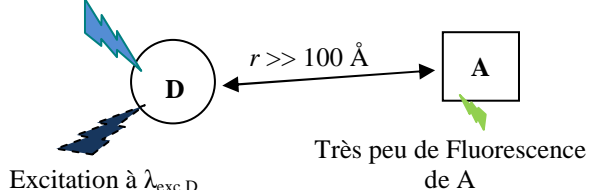


(b)



Cas 1 : pas d'interactions Donneur - Accepteur

Fluorescence élevée de D



Cas 2 : interactions Donneur - Accepteur

Très peu de Fluorescence de D

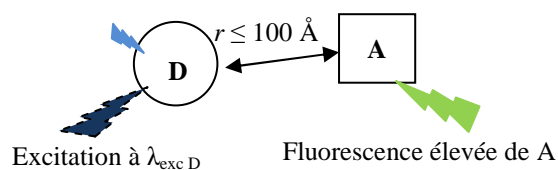


Figure 1.13. (a) : Superposition des spectres d'émission et d'absorption de l'accepteur (A) et du donneur (D). L'aire hachurée correspond au recouvrement spectral entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur. (b) : Spectre d'émission de fluorescence (excitation à $\lambda_{exc D}$) d'un mélange de donneur et d'accepteur : le cas 1 correspond à l'absence d'interaction D – A et le signal de fluorescence est celui de D avec éventuellement une contribution de A. Le cas 2 correspond à la présence de transfert d'énergie entre D et A qui se traduit par une modification du spectre de fluorescence : diminution de la contribution de D et augmentation de la contribution de A.

1.6.2.2. Intérêts de la fluorescence comme méthode de transduction du signal pour les analyses biologiques.

La fluorescence utilisée comme moyen de transduction du signal dans le domaine des biocapteurs présente de nombreux avantages.

Tout d'abord, le décalage de Stokes en longueur d'onde entre l'absorption et l'émission de photons fluorescents rend ce phénomène très intéressant pour la détection de molécules ou l'imagerie moléculaire. En effet, grâce à ce phénomène, on peut observer une scène dans une longueur d'onde différente de la lumière d'excitation et donc limiter la contribution du signal de fond, un filtrage adapté permettant de discriminer le signal d'excitation du signal de fluorescence qui, lui, est porteur d'informations.

Il faut cependant noter que le rôle du filtrage dans un dispositif de détection de fluorescence est d'autant plus important que la section efficace d'absorption des fluorophores est faible. En effet, considérons un fluorophore classiquement utilisé dans les biocapteurs, la Rhodamine B, positionné sur une surface S recevant une densité de puissance d'excitation D_p de 10^3 W.m^{-2} , qui est une densité de puissance moyenne dans les biocapteurs. On montre alors que le rapport entre l'énergie émise par la molécule de rhodamine et l'énergie d'excitation est :

$$\eta_{flu} = \frac{I_e}{I_{exc}} = \frac{QE \times I_a}{D_p \times S} = \frac{n \times QE \times D_p \times \sigma_a}{D_p \times S} = \frac{n \times QE \times \sigma_a}{S} \quad \text{Eq. 1.1.}$$

où I_e et I_{exc} sont la puissance émise par le fluorophore et la puissance d'excitation, QE désigne le rendement quantique du fluorophore, σ_a représente la section efficace du fluorophore et n le nombre de fluorophores sur le plot.

Pour une densité de molécules de rhodamine de $1 \text{ molécule}/\mu\text{m}^2$ située sur une surface de 1 mm^2 dont le rendement quantique QE est de 0,9 et la section efficace de 4.10^{-20} m^2 (Unger 1999), on calcule donc un rendement de conversion de fluorescence de : $\eta_{flu} = 3,6.10^{-8}$. Le filtrage doit donc permettre la détection d'un photon parmi 10^8 afin de pouvoir détecter une densité de $1 \text{ molécule}/\mu\text{m}^2$, densité représentant une bonne limite de détection à atteindre pour notre système.

Cependant, malgré ce faible rendement de conversion, certaines techniques de mesure de la fluorescence permettent l'observation de molécules individuelles (Unger 1999, Castro 2004, Rachet 2007). Cela est en effet possible en limitant par exemple le volume du milieu sondé et en utilisant des configurations permettant de limiter la contribution du signal d'excitation au niveau du détecteur en plus de l'utilisation d'un filtrage efficace. Cela démontre le fort potentiel en termes de sensibilité de cette méthode de transduction du signal.

Par ailleurs, il existe un grand nombre de molécules fluorescentes disponibles sur le marché dont les spectres d'émission couvrent l'ensemble du spectre visible et le proche Infra Rouge. Il est donc assez simple de choisir une molécule fluorescente correspondant aux contraintes expérimentales sur les domaines d'excitation ou d'émission.

D'autre part, la fluorescence est une méthode très sélective car :

- seuls les événements suivis par un traceur fluorescent pourront être détectés. En effet, l'utilisation de traceurs fluorescents permet de profiter des avantages des méthodes avec traceur en termes de spécificité par rapport aux méthodes sans traceur (voir paragraphe 1.5),

- le faible poids des molécules fluorescentes font qu'elles sont peu adsorbées de façon non spécifique sur le substrat de la réaction contrairement aux traceurs plus gros (microparticules magnétiques, enzymes). Cela limite ainsi les problèmes de non spécificité de détection et ce qu'ils impliquent (ex : étapes de lavage).
- la faible largeur spectrale d'émission des fluorophores fait qu'il est possible de restreindre fortement le domaine spectral de détection et donc de limiter la contribution de signaux parasites (typiquement l'autofluorescence de l'échantillon) qui ont un domaine d'émission beaucoup plus large,
- nous verrons dans le paragraphe 1.6.2.3 que l'utilisation d'un protocole de réaction utilisant la fluorescence couplée au phénomène de FRET permet d'améliorer encore la spécificité de détection grâce aux très faibles distances d'interaction du transfert d'énergie entre le fluorophore et son accepteur,
- Enfin, une analyse résolue en temps de l'émission des fluorophores peut éventuellement permettre d'améliorer encore la sensibilité et la spécificité de détection.

Il existe de plus diverses méthodes permettant de restreindre le volume de l'échantillon sondé afin d'augmenter encore la spécificité de détection.

En particulier, de nombreuses réalisations utilisent une excitation par une onde évanescente (Rowe 1999, Taitt 2005, Tschmelak 2005). Cette technique utilise le champ évanescent produit lors de la réflexion totale d'un rayon lumineux sur un dioptré (voir Figure 1.14 (a)), ou bien le champ évanescent produit par la propagation d'une onde dans un guide d'onde (voir Figure 1.14 (b)). La collection de la fluorescence se fait ensuite soit perpendiculairement au composant (Rowe 1999, Tschmelak 2005), ou bien dans le même guide d'onde utilisé pour l'excitation (Hofmann 2002, Mazurczyk 2006). Cette excitation à l'aide d'un champ évanescent a l'avantage de restreindre le volume d'excitation à un volume proche de la surface, limitant ainsi la contribution du signal de volume de l'échantillon et améliorant la sensibilité du système. Cependant, ce type de lecteur nécessite des précisions d'alignement très contraignantes afin de coupler la lumière dans le guide d'onde, ce qui limite fortement leur robustesse : une petite variation d'incidence peut entraîner une différence de signal importante.

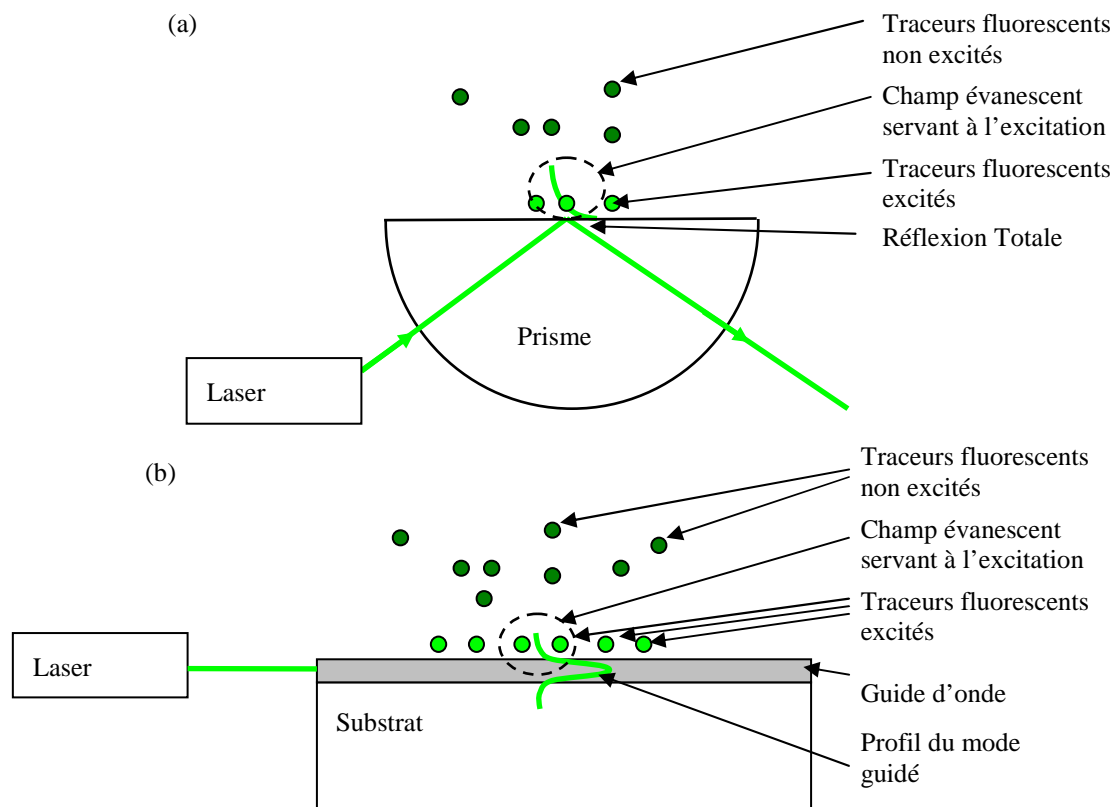


Figure 1.14. Schéma de principe de l'excitation par onde évanescente par réflexion totale (a) ou à l'aide d'un guide d'onde (b).

Une autre solution pour restreindre le volume sondé est de mesurer la fluorescence qui a été couplée dans le substrat (Robinson 1993, Hofmann 2002, Blue 2005). Dans ce cas, seul les fluorophores à proximité du substrat ($d < \lambda$) verront une part de leur énergie couplée dans le support de la réaction et ensuite guidée jusqu'à un détecteur. Cela permet aussi d'améliorer la spécificité de détection car on limite le volume de collection du signal aux seuls plots biologiques présents sur le support de la réaction. C'est ce principe qui a été retenu pour développer notre dispositif d'analyse comme nous le verrons dans le paragraphe 1.8.1.

En résumé, l'utilisation de traceurs fluorescents comme méthode de transduction du signal dans le domaine des biocapteurs permet :

- d'obtenir de très bonnes sensibilités de détection car il est possible de détecter individuellement ces traceurs,
- d'optimiser la spécificité de détection par l'emploi de traceurs permettant de suivre les événements de reconnaissance moléculaire,
- de limiter les problèmes d'adsorption non spécifique du fait du faible poids des marqueurs fluorescents organiques,
- d'effectuer des mesures en continu grâce aux méthodes de dosage ASDI et aux méthodes d'excitation ou de collection de la fluorescence permettant de restreindre le volume sondé.

1.6.2.3.Principe du protocole SPIT-FRI

Nous allons à présent détailler le protocole biologique SPIT-FRI mis en place au CEA et montrer les avantages qu'il peut apporter par rapport à un protocole biologique de type ASDI qui mesure une baisse de signal.

Afin d'améliorer les performances du protocole de dosage de type ASDI, le laboratoire du LERI du CEA Saclay a développé une nouvelle méthode de dosage basée sur une molécule particulière, le tripode. Cette molécule présente trois fonctions chimiques permettant la fixation i) d'un analogue de la molécule à doser, ii) d'un fluorophore et iii) du tripode sur le substrat.

Ce protocole utilise de plus le mécanisme de transfert d'énergie entre un fluorophore et un quencher afin d'optimiser les performances de sensibilité de détection du dosage. La mise au point de cette nouvelle méthode de dosage a été l'objet du travail de thèse du Dr Neuburger (Neuburger 2006).

Le principe, décrit sur la Figure 1.15, se décompose en trois étapes, plus une étape de régénération :

- a. on greffe sur le substrat la molécule tripode sur laquelle sont attachées un fluorophore et un analogue de la cible que l'on désire détecter,
- b. on fixe sur l'analogue présent sur le tripode un anticorps marqué par un deuxième fluorophore (le quencher ou l'accepteur) dont le spectre d'absorption recouvre le spectre d'émission du fluorophore lié au tripode (le donneur). La fixation de l'anticorps entraîne alors un phénomène de FRET entre le fluorophore du tripode et celui de l'anticorps, induisant une extinction de la fluorescence du donneur.
- c. lorsqu'il n'y pas d'analytes dans l'échantillon, on observe la dissociation spontanée des anticorps avec les analogues. Cela se traduit par une faible augmentation de la fluorescence du plot du fait de l'arrêt du phénomène de FRET à cause de l'éloignement de l'accepteur par rapport au donneur,
- d. lors de la présence d'analytes dans l'échantillon, il y a compétition entre les analogues et les molécules cibles accélérant la dissociation des complexes anticorps - analogues. Les anticorps vont préférentiellement former un complexe avec les molécules cibles en raison d'une plus grande affinité de l'anticorps avec ces dernières. Cela se traduit par une augmentation plus rapide de la fluorescence du plot du fait de l'arrêt du phénomène de FRET. L'augmentation du signal de fluorescence au niveau des tripodes est alors proportionnel à la quantité de cibles présentes dans l'échantillon,
- e. enfin, une étape de régénération du support est possible en faisant à nouveau réagir les tripodes avec les anticorps marqués par l'accepteur et spécifiques des cibles que l'on veut détecter. La fluorescence des plots biologiques est à nouveau éteinte, et ces derniers sont prêts pour un nouveau dosage.

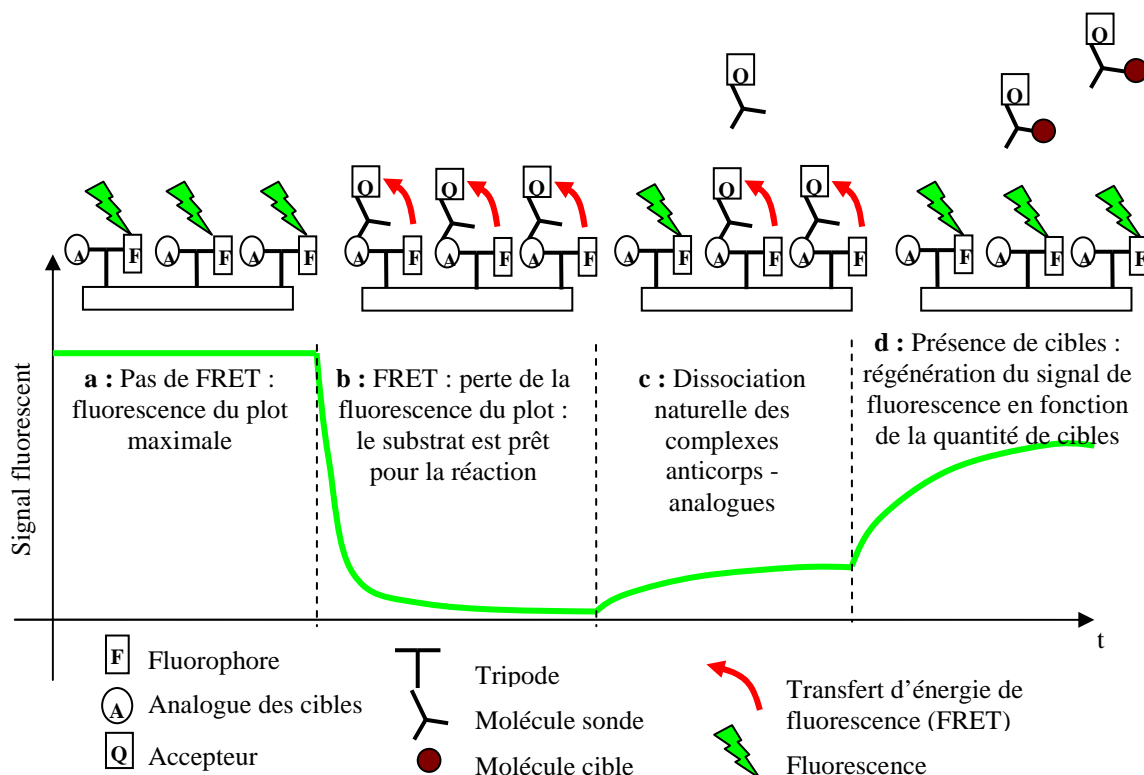
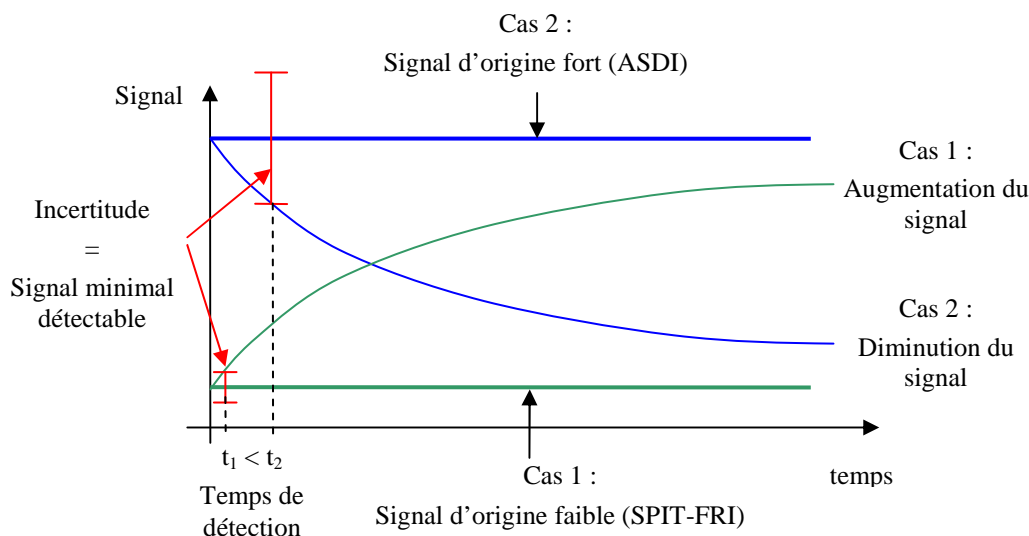


Figure 1.15. Principe de fonctionnement du dosage « SPIT-FRI » développé par le LERI (Volland 2005) : l'étape a correspond au greffage des Tripodes sur le support de la réaction. L'étape b représente la fonctionnalisation du plot en faisant réagir les anticorps spécifiques des molécules cibles avec les analogues des cibles accrochés aux tripodes. Ces anticorps étant marqués à l'aide d'accepteurs, on observe une extinction de la fluorescence du plot due à un transfert d'énergie (FRET) entre le fluorophore du tripode et l'accepteur. L'étape c correspond à la dissociation naturelle des complexes anticorps – analogues provoquant une faible augmentation du signal de fluorescence. L'étape d correspond enfin à l'injection des molécules cibles dans l'échantillon qui entrent en compétition avec les analogues, accélérant ainsi la restauration de la fluorescence des fluorophores fixés sur les tripodes.

En plus des avantages qu'offrent le protocole de dosage ASDI (voir § 1.5.2.2), ce protocole permet d'en améliorer la sensibilité. En effet, la présence des cibles est caractérisée par une augmentation du signal de fluorescence et non par une diminution comme c'est le cas pour un dosage ASDI. Ce type de dosage doit donc permettre une meilleure sensibilité car la limite de détection d'un système est donnée à partir du niveau de noir et de l'incertitude sur ce niveau qui définit le plus faible signal détectable. Cette incertitude est, en première approximation, proportionnelle à la racine carrée du signal car nous ne considérons que le bruit photonique dont la distribution est corrélée avec une loi de Poisson. Ainsi, pour un signal initial important (cas du protocole ASDI), on a une grande incertitude et donc une sensibilité moins bonne que pour un signal initial faible (cas du protocole SPIT-FRI) où l'incertitude est plus faible (voir Figure 1.16).

a



b

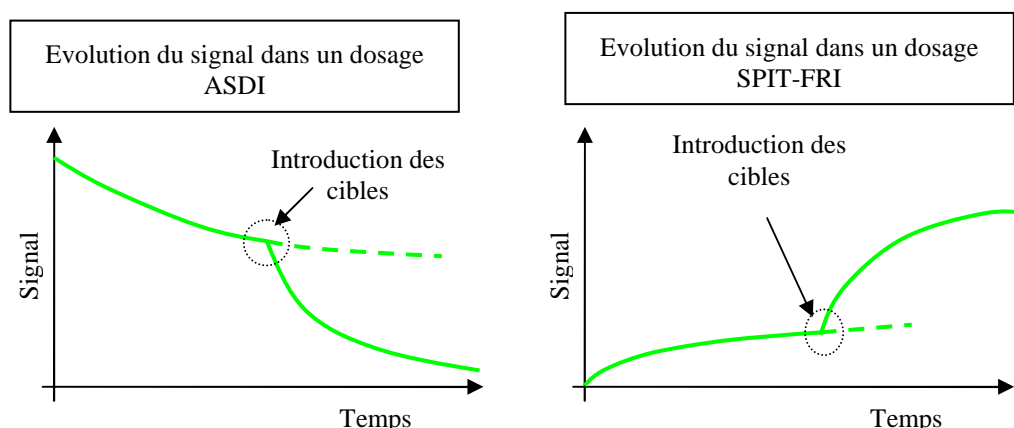


Figure 1.16. a : Comparaison des limites de détection d'un système de mesure par croissance du signal (cas 1 : système SPIT-FRI) et par décroissance du signal (cas 2 : système ASDI). La limite de détection est meilleure dans le cas 1. Est rappelée sur la figure b l'évolution du signal de fluorescence lors d'une réaction ASDI et d'une réaction SPIT-FRI.

Par ailleurs, le mécanisme de FRET étant un phénomène de champ proche, l'information portée par le signal optique est plus spécifique. En effet, dans le cas d'un dosage ASDI, il se peut qu'une fraction d'anticorps marqués soit adsorbée sur la surface de réaction de façon non spécifique, c'est-à-dire sans qu'il y ait association avec un analogue. Leur contribution au signal est donc aspécifique, ce qui peut réduire la sensibilité de la mesure.

Dans le cas de l'utilisation du FRET, l'extinction de la fluorescence n'apparaît que si les anticorps sont au voisinage immédiat des analogues (de l'ordre de 20 à 50 Å (Lakowicz 1983)). De même, il y a génération du signal uniquement si les anticorps s'éloignent de la surface. Il y a alors moins d'ambiguïté sur la provenance du signal d'où une meilleure spécificité du signal de fluorescence mesuré.

Ce protocole biologique doit donc permettre d'améliorer les performances de détection par rapport aux protocoles de type ASDI en termes de spécificité et de sensibilité de détection.

1.7. Problèmes intrinsèques des systèmes existants

Nous allons maintenant passer en revue plusieurs systèmes de détection d'agents pathogènes que nous comparerons à notre cahier des charges. Nous nous limiterons aux systèmes basées sur une méthode de transduction par fluorescence car nous avons déjà montré les limitations en termes de spécificité et de mesure en continu des autres méthodes. Cela nous permettra de nous positionner par rapport à l'état de l'art décrit dans la littérature.

Dans un premier temps, les systèmes fortement intégrés seront présentés et nous donnerons leurs limitations pour des applications sensibles telles que la détection de pollutions d'origine industrielle ou agricole. Nous détaillerons ensuite les dispositifs de nos principaux concurrents identifiés pour les applications hors laboratoires et ce en fonction de nos contraintes.

1.7.1. Les systèmes fortement intégrés

Les applications hors laboratoire nécessitent des instruments très compactes et robustes afin d'être transportables sur le lieu de mesure. Une solution pour réaliser ce type de dispositifs est d'intégrer au maximum les différentes fonctions optiques (sources d'excitation, détecteur, systèmes de filtrage, ...) dans le composant.

Dès 1988, Marsonner (Marsoner 1988) publie le principe d'un système hautement intégré basé sur une détection optique. Ce principe consiste à directement greffer les molécules sondes sur une matrice de capteurs optiques de type CCD ou capteurs d'image bas coût (de type CMOS ou « active Pixel ») (Vo-Dinh 1999). Cependant, l'utilisation de marqueurs fluorescents nécessite l'utilisation de sources d'excitation et de filtres très sélectifs afin de dissocier le signal de fluorescence de son excitation. Cela rend le système global complexe, relativement coûteux et limite sa sensibilité car elle dépend de la qualité de ce filtrage. Pour contourner ce problème, Mallard et al. (Mallard 2005) proposent alors d'utiliser des enzymes permettant la génération de lumière en présence d'un produit particulier et montrent des résultats intéressants sur une puce à ADN multi plots. Les étapes de lavage inhérentes aux systèmes basés sur des enzymes interdisent cependant une utilisation en continu de ce type de dispositif.

En 2004, Chediak et al. propose une nouvelle architecture dans laquelle aussi bien les sources d'excitations que le détecteur optique sont intégrés dans le composant (Chediak 2004). Ce système, potentiellement multiplexe et entièrement intégré, est décrit sur la Figure 1.17. Il utilise l'empilement d'une photodiode (détection), d'un filtre (arrêt du signal d'excitation), d'un film électroluminescent de type PLED (excitation) et d'une chambre fluide pour la circulation de l'échantillon. Les performances en termes de sensibilité n'est cependant pas très bonne (limite de détection de l'ordre de 120 nM de fluorescéine) principalement du fait d'un filtrage peu efficace du signal d'excitation. Par exemple, notre équipe a montré qu'il est possible de détecter une concentration de 50 fM du même produit, soit $2,6 \cdot 10^6$ fois plus faible (Schultz 2003).

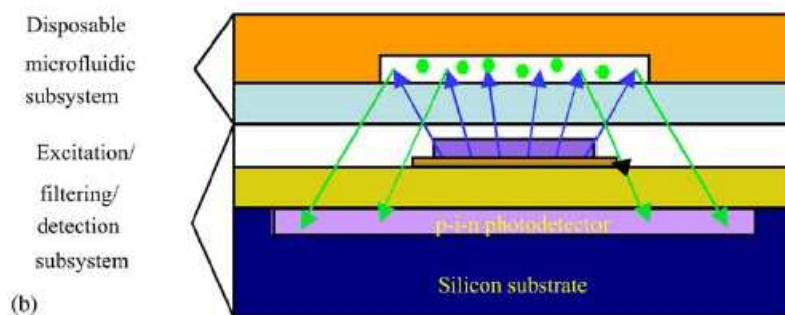


Figure 1.17. Principe d'un système avec détection optique entièrement intégrée. D'après (Chediak 2004).

Une équipe américaine a aussi proposé l'utilisation de sources basées sur des matériaux organiques ou polymères électroluminescents de types OLED ou PLED dont les coûts de fabrication sont potentiellement très faibles. (Choudury 2004). Un autre dispositif entièrement intégré a été présenté par les équipes de l'Institut de Microélectronique en Grèce et le Fraunhofer Institute en Allemagne (Misiakos 2004). Ce dispositif (voir Figure 1.18) utilise les technologies de la microélectronique afin d'assembler sur un support de Silicium une source optique (une LED), une fibre optique pour amener le signal d'excitation sonder le milieu biologique et un détecteur. Un module fluide réalisé dans un capillaire en polymère permet ensuite de faire circuler l'échantillon sur le dispositif de détection.

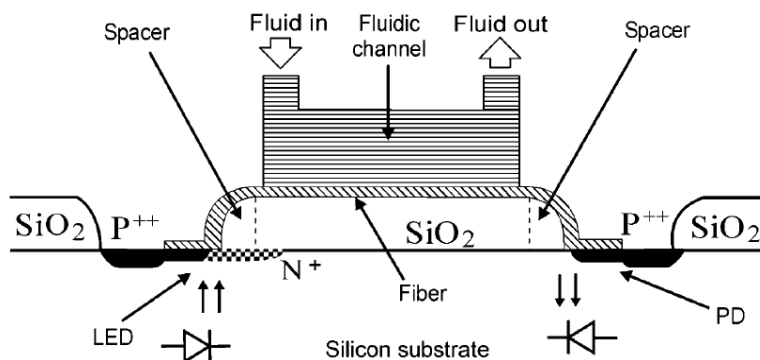


Figure 1.18. Principe de la détection intégrée selon Misiakos (Misiakos 2004). La lumière, injectée dans un guide d'onde, sonde l'échantillon par sa composante évanescente. La mesure est réalisée en bout de fibre.

Ces dispositifs entièrement intégrés possèdent les avantages d'être très robustes et compacts et, pour certains, d'être compatibles avec les technologies de la microélectronique (Misiakos 2004).

Cependant, ces instruments ne sont pas suffisamment sensibles pour les applications hors laboratoire que nous visons en particulier à cause des problèmes de filtrage de l'excitation. Ils ne peuvent donc pas satisfaire le cahier des charges que nous nous sommes défini.

1.7.2. Principaux concurrents identifiés

Le domaine des méthodes d'analyses biologiques hors laboratoire est aujourd'hui représenté principalement par deux équipes qui ont mis au point des systèmes portables et présentant des limites de détection suffisamment basses. Par "système", nous entendons un ensemble complet comportant, outre le biocapteur, toutes les fonctions

de service permettant le déroulement des analyses en automatique, à l'image du système développé au laboratoire (Schultz 2007).

Le système AWACSS développé par l'équipe du Pr. Gauglitz

Le système AWACSS (Automated Water Analyser Computer Supported System) a été développé à l'université de Tübingen en Allemagne par l'équipe du Pr Gauglitz (Tschmelak 2005). Ce dispositif, basé sur une détection optique, utilise une onde évanescente pour sonder le milieu biologique et un système de fibres optiques pour la collection du signal de fluorescence des 32 plots biologiques différents vers un détecteur (voir Figure 1.19).

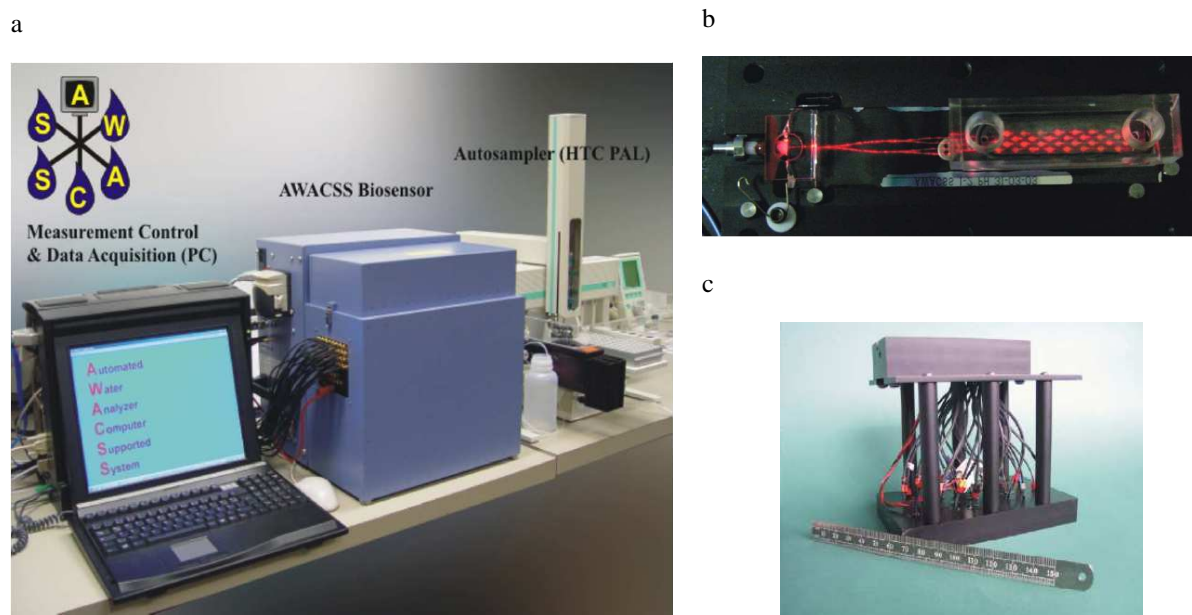


Figure 1.19. Photographie du système AWACSS. a : photographie du système complet comprenant le dispositif de préparation des échantillons (Autosampler), le système de détection des agents pathogènes (AWACSS) et l'ordinateur permettant l'interprétation des résultats. b : photographie du composant sur lequel la réaction biologique a lieu avec visualisation des différentes zones sensibles et du signal d'excitation par onde évanescente. c : photographie du système de collection de la fluorescence des plots biologiques vers une matrice de photodiode à l'aide d'un ensemble de fibres optiques adressées à chacune des zones sensibles. Ces photographies ont été reprises de la publication Tschmelak 2005.

Ce système relativement compact et facile d'utilisation a été couplé à un dispositif de collection d'eau de rivière et de préparation d'échantillon pour la surveillance en continu de la présence de polluants dans les eaux de rivière. Les performances de ce dispositif en termes de sensibilité et de reproductibilité de mesure sont comparables à celles des instruments de laboratoires et les techniques utilisées en immuno-analyse comme le test ELISA. De plus, le caractère multiplexe du dispositif a été validé, démontrant les bonnes performances de spécificité de détection et ce même dans des échantillons complexes, grâce à un dosage immunologique et une excitation par onde évanescente (Figure 1.19 b).

Cependant l'architecture, en particulier le système optique d'injection du signal d'excitation dans un guide d'onde (Figure 1.19 b) et de collection de la fluorescence par des fibres optiques (Figure 1.19 c), semble complexe et insuffisamment robuste pour une utilisation de routine hors laboratoire. En effet, aussi bien le système d'excitation que celui de détection demandent une très bonne précision d'alignement. De plus, le système de fibres optiques ne permet pas d'avoir un instrument intégré, nuisant à la compacité de l'ensemble.

Les principales limitations de ce système sont donc sa faible robustesse et sa faible compacité.

L'Array Biosensor développé par l'équipe de F.S. Ligler

Le système Array Biosensor développé au Naval Research Laboratory (USA) par l'équipe de F.S. Ligler est sans doute le système le plus abouti à ce jour (Rowe 1999, Sapsford 2002, Golden 2005, Sapsford 2006). Ce système utilise aussi une excitation par onde évanescence et collecte la fluorescence des différentes zones sensibles à l'aide d'une caméra CCD (voir Figure 1.20 b). Le système est intégré à l'intérieur d'une mallette transportable avec une gestion automatique des différents échantillons (voir Figure 1.20 a).

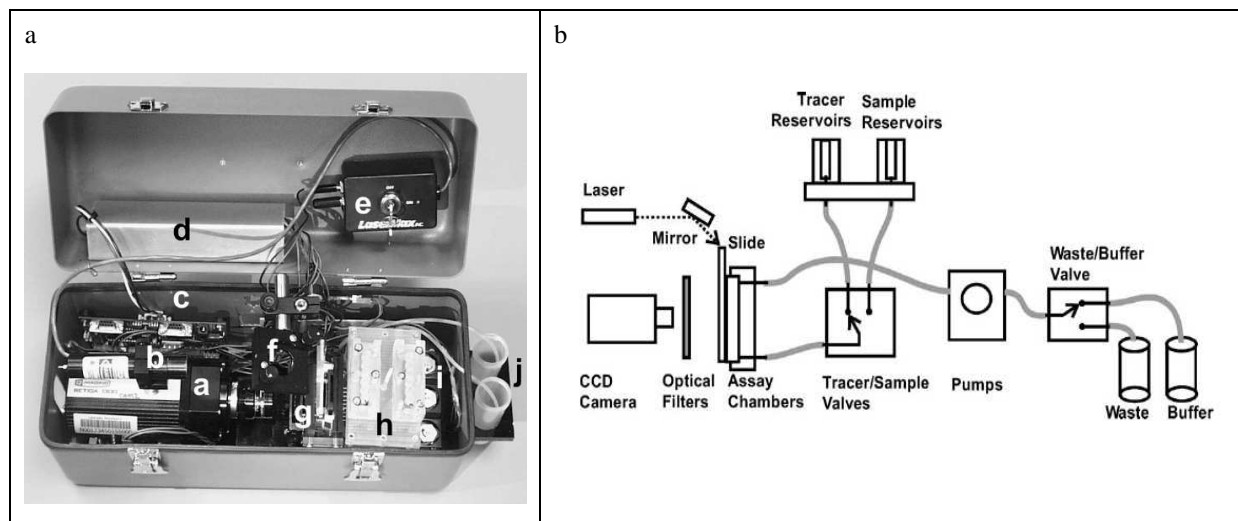


Figure 1.20. a : Photographie du système Array Biosensor développé par l'équipe de F.S. Ligler au Naval Research Laboratory (USA). b : schéma du principe de fonctionnement de l'Array Biosensor. Photographie et schéma repris de la publication Golden 2005.

Ce dispositif permet l'analyse simultanée d'une dizaine d'agents pathogènes et ce suivant plusieurs protocoles de dosages biologiques (Sapsford 2002, Sapsford 2006, Ligler 2003). Il est ainsi capable de détecter aussi bien de grosses que de petites molécules et peut réaliser des mesures en continu lorsqu'une méthode de type ASDI est utilisée. Les limites de détection obtenues par ce système sont, par ailleurs, comparables avec celles des instruments de laboratoires. De plus, la spécificité de détection de ce dispositif a été démontrée par la détection simultanée de plusieurs agents pathogènes dans des échantillons complexes. Cette spécificité est à nouveau obtenue grâce aux propriétés des dosages immunologiques utilisés et par le fait d'une excitation confinée sur la surface de la réaction biologique.

Cependant, ce système utilise une excitation par une onde évanescence qui nécessite de très bonnes précisions d'alignement afin d'injecter le signal d'excitation dans le guide d'onde. De plus, un système d'imagerie est nécessaire afin de mesurer la fluorescence des différentes zones sensibles. Aussi bien le module d'excitation que celui de détection limitent la robustesse du dispositif et le rendent coûteux, en particulier à cause du système d'imagerie.

Enfin, ce système est aujourd'hui principalement utilisé pour des mesures en point final et non en continu : si les réactions sont réalisées dans l'appareil, l'étape de lecture est faite après un lavage.

Bien qu'offrant de bonnes sensibilité et spécificité de détection, et Les systèmes AWACSS, développé à l'université de Tübingen (Allemagne), et Array Biosensor, développé au Naval Research Laboratory (USA),

sont peu robuste principalement du fait de la méthode d'excitation des marqueurs fluorescents utilisée. La méthode d'excitation par onde évanescente ne nous a donc pas paru adapter à une utilisation à l'extérieur d'un bâtiment ainsi que la collection de la fluorescence par fibres optiques ou par objectif de caméra.

Nous avons alors cherché à développer un instrument présentant les mêmes performances en termes de sensibilité et de spécificité de détection, mais dont la robustesse et la compacité soient meilleures afin d'être utilisable en routine hors laboratoire par des personnes non qualifiées. De plus, nous avons essayé d'utiliser des composants optiques simples afin de réaliser un système pouvant à terme être bon marché.

1.8. Description de notre dispositif instrumental

Le dispositif instrumental mis au point au laboratoire LISA (Galland 2004, Du Bouëtiez 2006) va à présent être décrit. Nous présenterons ensuite les avantages et limitations de ce système pour la détection d'un signal de fluorescence et donnerons brièvement les performances actuelles obtenues avec cet instrument.

Enfin, une présentation de deux systèmes fonctionnant sur un principe similaire à celui développé au laboratoire sera effectuée. Nous nous attacherons, dans la suite de ce mémoire, à montrer l'intérêt de l'architecture que nous avons utilisé par rapport à la leur.

1.8.1. Principe instrumental

Le principe instrumental de ce dispositif est le suivant :

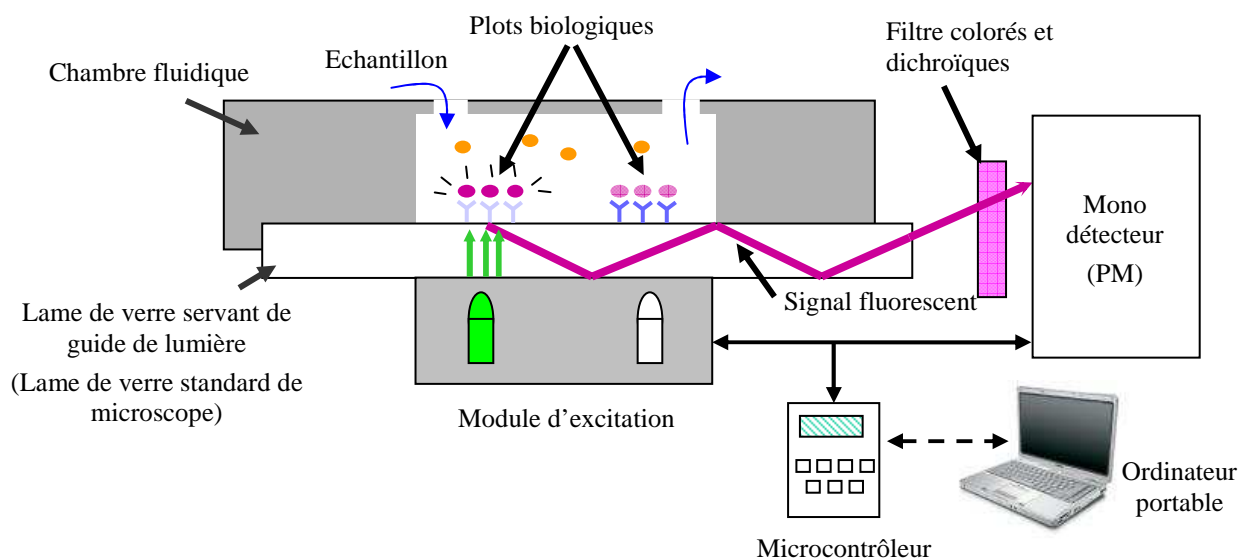


Figure 1.21. Schéma de principe de l'instrument développé dans le laboratoire LISA pour la détection d'agents pathogènes hors laboratoire. Cet instrument utilise le couplage en champ proche dans la lame de verre de la fluorescence des plots biologiques situés à la surface de cette dernière. Ce signal est en suite guidé par réflexion totale jusqu'à un détecteur situé en bout de lame. Le caractère multiplexe de l'instrument est réalisé en excitant un par un les différents plots biologiques situés à la surface de la lame de verre.

Cet instrument est constitué :

- d'une lame de verre standard de microscope (25x75x1 mm) servant à la fois de support aux réactions biologiques ainsi que de collecteur et de guide de lumière pour le signal de fluorescence issu des plots biologiques,
- d'un détecteur de type photomultiplicateur situé en bout de lame pour la détection du signal de fluorescence issu des plots biologiques. Ce détecteur est équipé d'un filtre dichroïque et d'un filtre coloré afin de discriminer les signaux parasites du signal de fluorescence,
- d'un module d'excitation externe constitué de plusieurs LED chacune positionnées en regard d'un plot biologique situé sur la face opposée de la lame de verre. L'émission de ces sources d'excitation est filtrée à l'aide d'un filtre dichroïque adapté au domaine d'excitation des fluorophores utilisés. L'excitation dissociée de chacun des plots biologiques situés sur la surface de la lame permet d'obtenir un instrument multiplexe,
- d'une chambre fluide permettant la circulation et le confinement de l'échantillon à tester sur la surface de la lame de verre afin de faire réagir les éventuelles molécules cible présentes dans l'échantillon avec les plots biologiques,
- d'un microcontrôleur et d'un ordinateur portable permettant une gestion automatique des différents paramètres nécessaires à une mesure (sources d'excitation, acquisition du signal de fluorescence, gestion du débit et des vannes des différentes solutions utilisées, contrôle de la température, ...).

Le fonctionnement de cet instrument repose sur le couplage en champ proche des signaux de fluorescence des plots biologiques dans la lame de verre, signaux qui sont ensuite guidés par réflexion totale dans la lame jusqu'au détecteur.

Le couplage en champ proche dans la lame de verre

Le phénomène de couplage en champ proche des signaux de fluorescence dans la lame provient d'une interaction forte entre le substrat, ici la lame de verre, et les fluorophores situés à proximité de la lame ($z_\mu < \lambda$ où z_μ représente l'altitude du fluorophore au dessus du substrat, et λ la longueur d'onde d'émission de ce fluorophore). Ce phénomène d'interactions entre le fluorophore et le substrat a fait l'objet de nombreuses études depuis la mise en évidence de l'influence du milieu extérieur sur les propriétés d'émission d'un dipôle (Carniglia 1972, Drexhage 1974, Lukosz 1977 a, Lukosz 1977 b, Chance 1978, Lukosz 1979, Ford 1984, Hellen 1987, Barnes 1998). Ces études ont montré les interactions existantes entre le substrat et le fluorophore, avec en particulier une perte importante de l'énergie du dipôle dans le substrat. Il a ainsi été montré que jusqu'à 34 % de l'émission d'un dipôle situé en milieu aqueux à l'interface d'une lame de verre (d'indice de réfraction de 1,51) pouvait être couplée et piégée par réflexion totale dans cette dernière (Ruckstuhl 2000 et Figure 1.22).

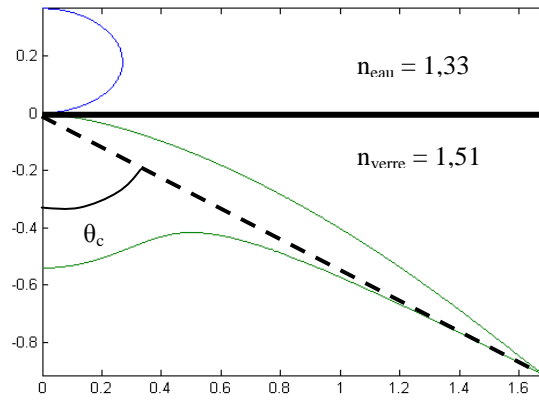


Figure 1.22. Diagramme d'émission d'un ensemble de fluorophores orientés de façon isotrope et situés à l'interface entre un milieu aqueux (d'indice de réfraction de 1,33) et une lame de verre (d'indice de réfraction de 1,51). On observe une émission importante du dipôle au dessus de l'angle limite de réflexion totale (θ_c) qui correspond au signal couplé dans la lame de verre. Ce diagramme d'émission a été calculé à partir des codes développés au paragraphe 2.5.2.

Ce phénomène de couplage en champ proche du signal de fluorescence dans la lame peut être appréhendé comme étant le phénomène inverse de l'excitation de molécules fluorescentes par onde évanescente (Carniglia 1972). Lorsqu'une onde lumineuse se propage d'un milieu plus réfringent (n₁) vers un milieu moins réfringent (n₂ < n₁) avec un angle supérieur à l'angle limite de réflexion totale θ_c, la totalité de son énergie est réfléchi et reste dans le milieu le plus réfringent (Figure 1.23). D'après les lois de Snell-Descartes, cet angle limite de réflexion totale est défini par la relation suivante :

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_2}{n_1} \quad \text{Eq. 1.2.}$$

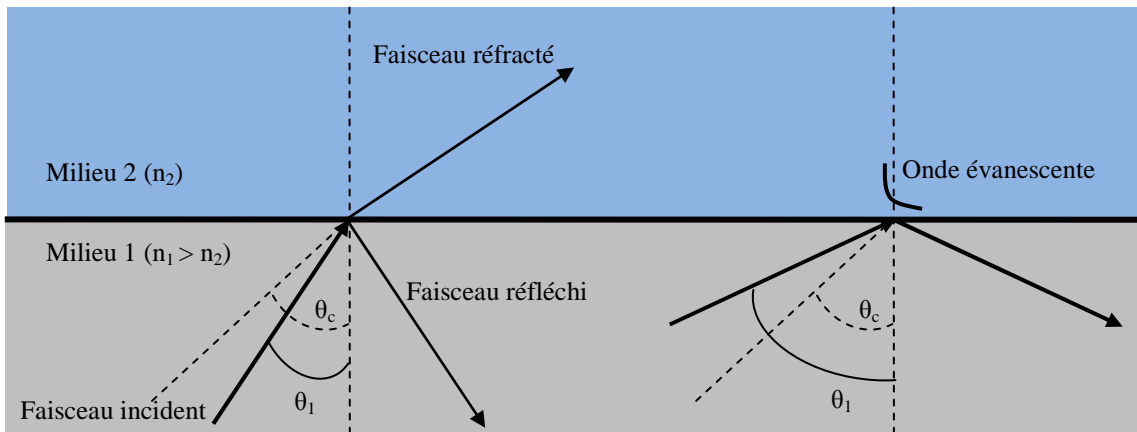


Figure 1.23. Passage d'un faisceau lumineux d'un milieu d'indice de réfraction n₁ à un milieu d'indice de réfraction n₂ plus faible en fonction de son angle d'incidence θ₁. Si cet angle est inférieur à l'angle critique θ_c il y a réflexion et transmission du faisceau lumineux. Par contre si θ₁ est supérieur à θ_c alors il y a réflexion totale du faisceau dans le milieu 1.

Cependant, la nature ondulatoire de la lumière implique la présence d'énergie dans le milieu le moins réfringent (ici le milieu 2), énergie qui peut être décrite à partir des relations de continuité des champs électrique et magnétique entre les milieux 1 et 2. Cette énergie est confinée à l'interface entre les deux milieux et décroît

exponentiellement dans le milieu le moins réfringent : on parle d'ondes évanescentes. Les méthodes de transduction du signal par fluorescence avec excitation par onde évanescente utilisent cette énergie afin d'exciter uniquement les fluorophores situés à la surface du support de réaction. Cela permet ainsi de limiter la contribution de la fluorescence d'ensemble du volume et donc de limiter l'offset sur la mesure (Ligler 2003, Golden 2005, Tschmelak 2005, Taitt 2005, Rachet 2007).

Selon le principe du retour inverse de la lumière, une onde évanescente située à l'interface d'une lame de verre, produite par exemple par l'émission d'un fluorophore, peut donc être couplée dans la lame et se propager dans cette dernière par réflexion totale. Les molécules présentes dans le volume évanescent créée par une réflexion totale se comportent alors comme si elles étaient matériellement dans le milieu le plus réfringent car elles ont la capacité, d'une part, d'absorber l'énergie des ondes se propageant dans le milieu de plus fort indice de réfraction via leur parties évanescentes et, d'autre part, d'émettre de la lumière dans ce même milieu. C'est le principe de fonctionnement de notre dispositif. Cette équivalence entre couplage et découplage évanescent a clairement été montré par Carniglia et al. (Carniglia 1972).

On note par ailleurs que ce principe permet aussi de discriminer les signaux de volume des signaux de surface limitant ainsi l'offset sur les mesures. En effet, seules les ondes évanescentes produites par des molécules suffisamment proches du milieu de plus fort indice de réfraction pourront « voir » la lame de verre et donc se coupler dans cette dernière. Les modes rayonnés peuvent aussi contribuer au signal mais de façons marginales car seule la fraction transmise dans la lame puis subissant les réflexions successives sur ces bords sera détectée ce que l'on peu considérer comme négligeable au vue des distances et donc du nombre de réflexions à prendre en compte.

Plusieurs travaux ont été réalisés afin de tirer profit de ces interactions entre les fluorophores et le substrat, support de la réaction biologique. Cela a consisté soit à limiter les pertes d'énergie dans le substrat et à rediriger le signal vers un détecteur situé au dessus du substrat à l'aide d'un réseau (Holland 1985), d'un empilement de couches minces (Sullivan 1994, Barritault 2002, Bras 2004) ou encore à l'aide de structures macroscopiques (Blue 2005, Ruckstuhl 2000). D'autres équipes ont cherché à utiliser l'énergie couplée dans le substrat afin de la guider vers un détecteur en bout de substrat (Robinson 1993, Gouin 1998, Hofmann 2002, Galland 2004, Gachet 2004, Seiler 2006, Schultz 2007).

1.8.2. Avantages et limitations de cet instrument

Cet instrument présente plusieurs avantages pour répondre aux contraintes du cahier des charges que nous nous sommes fixé pour la détection d'agents pathogènes hors laboratoire :

Tout d'abord cet instrument est potentiellement très robuste et compact :

- le module d'excitation de la fluorescence des plots biologiques est simple et ne nécessite pas d'éléments optiques complexes,
- la contrainte d'alignement entre les plots biologiques positionnés sur la surface de la lame et les sources d'excitation sont bien moins importantes que pour l'injection du signal d'excitation dans un guide d'onde dans le cas d'une excitation par onde évanescente (Golden 2005, Rowe 1999, Tschmelak 2005), ce qui rend plus robuste notre instrument par rapport à ces systèmes,
- le caractère multiplexe de l'instrument ne nécessite ni un système de balayage mécanique encombrant et

complexe, comme c'est le cas pour des scanners classiquement utilisés en laboratoire, ni un système d'imagerie nécessitant des optiques complexes (Tschmelak 2005), un détecteur résolu spatialement (Golden 2005, Rowe 1999), et un alignement précis,

- la collecte et la détection du signal fluorescent des plots biologiques ne nécessitent aucun élément optique car le détecteur est directement positionné et plaqué au bout de la lame de verre et la collecte du signal dans la lame se fait par un couplage en champ proche ne demandant pas de dispositif optique particulier,
- le fait que l'on collecte la fluorescence dans une direction perpendiculaire au signal d'excitation nous permet de réduire les contraintes sur le filtrage et ainsi de simplifier l'instrumentation. Cela peut de plus permettre d'atteindre de bonnes sensibilités de détection du fait d'un faible offset sur les mesures.

Cette instrumentation est donc plus robuste mécaniquement que les dispositifs de nos principaux concurrents et est potentiellement très compacte car aucun composant optique complexe n'est utilisé.

D'autre part, la collecte du signal de fluorescence par un couplage en champ proche dans la lame de verre permet :

- de collecter une part importante (jusqu'à un tiers) du signal émis par le fluorophore permettant d'obtenir des limites de détection comparables aux instruments de laboratoire de type scanners ou microscopes à épi-fluorescence,
- de restreindre le volume de mesure afin de limiter la contribution des signaux de volume, signaux non spécifiques de la détection de molécules cible. Cela doit donc permettre d'améliorer la spécificité de détection par rapport à des systèmes dont le volume de mesure n'est pas restreint à la surface de réaction et d'effectuer des mesures dans des milieux complexes sans être limité par leur autofluorescence. De plus, cela nous permet de réaliser des mesures en continu sans être gêné par l'autofluorescence du volume et les signaux des éventuels traceurs présents dans la solution.

Par ailleurs, ce dispositif peut être utilisé pour différents protocoles biologiques dont les protocoles ASDI et SPIT-FRI permettant une mesure en continu de l'échantillon.

Enfin, ce dispositif consomme peu d'énergie, paramètre important pour une grande autonomie. En effet, les LED et détecteur utilisés dans cet instrument ne nécessitent pas de puissances importantes pour leur fonctionnement.

Cet instrument présente donc de nombreux avantages pour une utilisation hors laboratoire. La simplicité optique et les faibles contraintes d'alignement en font un instrument intrinsèquement robuste et compact ce qui constitue le principal avantage vis-à-vis de nos concurrents. Par ailleurs, le prix d'un tel instrument est potentiellement faible car aucun composant optique ou mécanique complexe n'est utilisé.

Cependant, cet instrument possède certaines limitations :

- une perte de signal en fonction de l'éloignement du plot biologique sondé par rapport au détecteur a été observée. En effet, suivant cette distance une part plus ou moins importante du signal couplé dans la lame atteint le détecteur situé en bout de lame (voir Figure 1.24). Nous utiliserons le terme vignelage pour désigner ce phénomène.

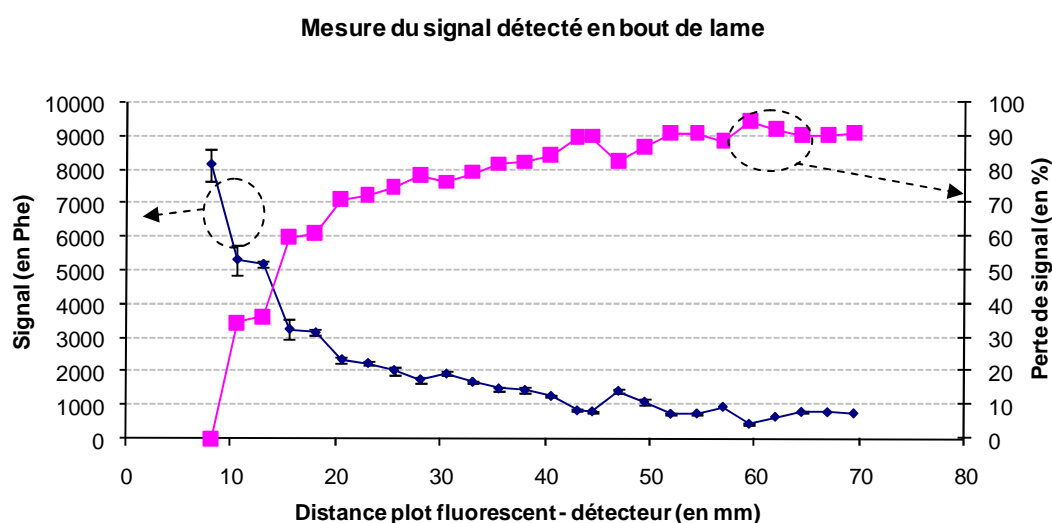


Figure 1.24. Mesure du signal détecté en bout d'une lame standard de microscope en fonction de la distance entre le plot fluorescent et le détecteur. Le signal est mesuré en photo-événements (Phe) qui représentent les électrons issus de la conversion des photons en électrons par la photocathode du détecteur avant amplification.

Toutefois, cette perte de signal peut être minimisée en utilisant un détecteur dont la photocathode correspond à la taille de la face de sortie de la lame de verre. Le détecteur utilisé actuellement est donc un photomultiplicateur Hamamatsu H8249-10 dont la taille de sa photocathode est de 20x4 mm².

De plus, nous observons qu'à partir d'une certaine distance (supérieur à 20 mm), cette perte de signal diminue ce qui nous permet de minimiser l'influence de ce phénomène entre les différents plots biologiques. Une caractérisation précise de ce phénomène, par la réalisation d'une fonction d'instrument, doit permettre la correction en temps réel des mesures suivant la position du plot interrogé par rapport au détecteur.

Enfin, les mesures effectuées étant des mesures en continu de cinétiques de réaction, l'information est contenue dans les variations du signal au cours du temps et non dans les différences de signal entre les différents plots biologiques, ce qui limite l'influence de ce phénomène sur nos mesures.

- Il a enfin été montré que l'état de surface des bords de la lame influence le guidage et donc la quantité de signal détectable en bout de lame. Nous ne nous sommes cependant pas attardé sur ce phénomène car les performances obtenues sur de simples lames standards de microscope ayant des bords bruts sont tout à fait satisfaisantes actuellement.

1.8.3. Performances actuelles de l'instrument

Aujourd'hui, un dispositif transportable et intégré à l'intérieur d'une mallette de petite dimension (≈ 10 L) a été réalisé par l'équipe projet (voir Figure 1.25). Deux prototypes sont quotidiennement utilisés à Saclay par l'équipe du Dr. Volland et un troisième, alimenté par une batterie de voiture, a été utilisé avec succès hors laboratoire par une équipe du CEA.

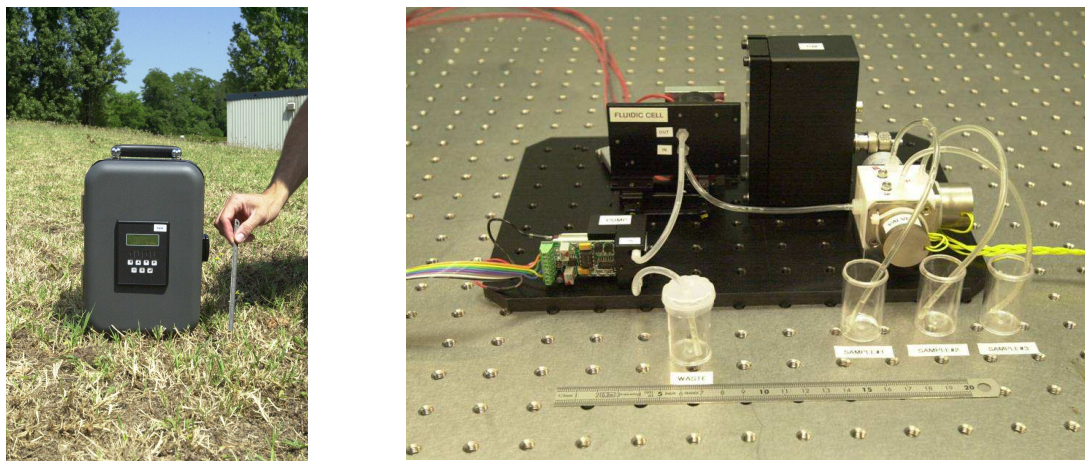


Figure 1.25. Photographie de l'extérieur et de l'intérieur du dispositif instrumental intégré à l'intérieur d'une mallette.

Des expériences ont été réalisées pour valider le caractère multiplexe de l'instrument par la détection simultanée et indépendante de deux agents pathogènes et des performances comparables à celle d'instruments de laboratoires et de nos principaux concurrents ont été obtenues (Schultz 2007).

1.8.4. Systèmes similaires

D'autres architectures de biocapteurs multiplexes fonctionnant aussi sur un couplage en champ proche du signal de fluorescence dans le substrat ont été utilisées par d'autres équipes (Gachet 2004, Seiler 2006). Ces systèmes diffèrent de celui développé au laboratoire principalement sur la méthode employée pour réaliser un composant multiplexe.

Au lieu de discrétiser le signal des différents plots biologiques à l'excitation, comme c'est notre cas, ils utilisent un ensemble de guides d'ondes afin de guider le signal des différents plots biologiques excités par une seule source vers un détecteur optique résolue spatialement (caméra CCD, barrette de photodiodes).

Deux architectures peuvent être utilisées :

- un substrat en verre sur lequel sont réalisés des guides d'onde par une technique d'échange d'ions (voir paragraphe 3.3.4.1) (Gachet 2004). Ces guides d'onde servent à cheminer le signal en bout de composant vers un détecteur. L'excitation se fait par une source positionner au dessus du composant et éclairant l'ensemble de la puce. Le caractère multiplexe de l'instrument provient alors de la discrétisation des signaux des différents plots biologique par le détecteur résolu spatialement :

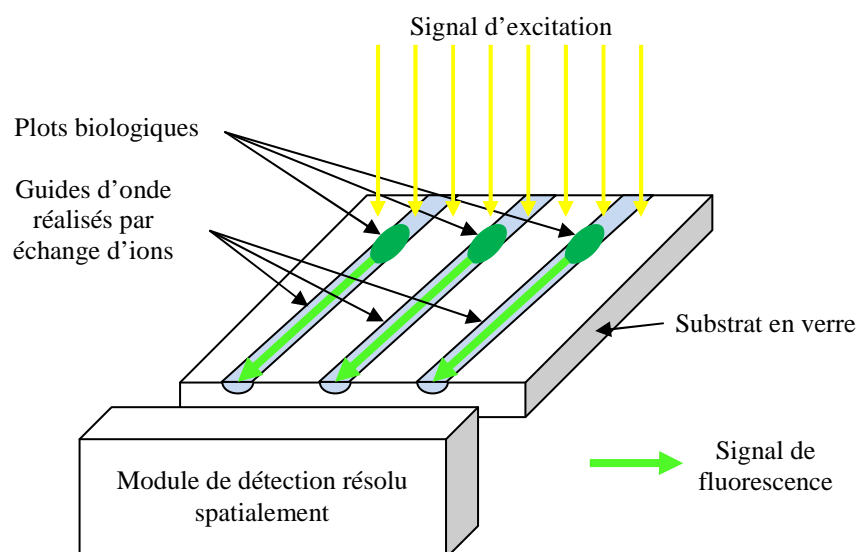


Figure 1.26. Schéma de principe du système développé par Gachet (Gachet 2004). Les différents plots biologiques sont excités simultanément normalement au substrat. La fluorescence est collectée dans des guides d'onde chacun adressés à un plot biologique. Le signal est ensuite guidé vers un détecteur résolu spatialement en bout de composant.

- un substrat en Silicium sur lequel est déposé une couche de Silice dans laquelle sont gravés des guides d'onde en Nitrure de Silicium (Seiler 2006). Chacun des guides d'onde est adressé à une photodiode d'une barrette de photodiodes située en bout de composant. L'excitation des différents plots biologique est aussi réalisé par une seule source située au dessus du composant et éclairant l'ensemble de la puce. La discrimination de signaux des différents plots biologiques est alors réalisée grâce à la résolution spatiale du détecteur :

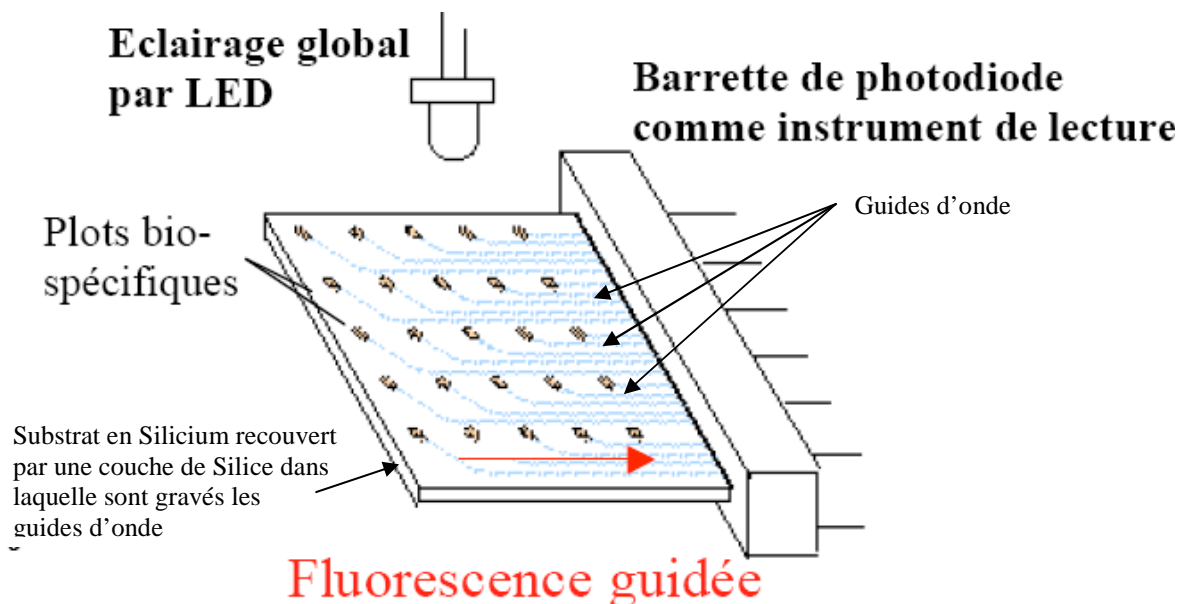


Figure 1.27. Schéma de principe du système développé par Seiler (d'après Seiler 2006). Les différents plots biologiques sont excités simultanément normalement au substrat. La fluorescence est collectée dans des guides d'onde chacun adressés à un plot biologique. Le signal est ensuite guidé vers un détecteur résolu spatialement en bout de composant.

Ces systèmes utilisent donc aussi le couplage en champ proche du signal de fluorescence des plots biologiques dans le substrat afin de le guider vers un détecteur situé en bout de lame. Cependant, les performances obtenues en termes de limite de détection ne sont pas bonnes en comparaison des performances que nous obtenons.

Dans le cas du système développé par Gachet (Gachet 2004), un détecteur ayant une très bonne résolution spectrale doit être utilisé afin de pouvoir détecter le signal de fluorescence des plots biologiques. Le signal spécifique est donc noyé dans des signaux parasites (excitation, signal des autres plots biologiques) ce qui nuit fortement au rapport signal sur bruit du signal détecté.

Dans le cas du système développé par Seiler (Seiler 2006), la spécificité du signal parvenant au détecteur est meilleure mais très peu de signal de fluorescence y arrive. Leur limite de détection est donc limitée car ils ne détectent pas assez de signal.

Nous donnerons au chapitre 2 (voir § 2.5.3.3) les raisons de ces faibles performances ce qui nous permettra de confirmer l'intérêt de l'architecture développée au laboratoire utilisant une discrétisation des signaux des différents plots biologiques à l'excitation et non à l'émission comme ces systèmes.

1.9. Objectifs et travail réalisé au cours de la thèse

Dans ce paragraphe, les objectifs du travail de thèse vont être définis. Nous détaillerons ensuite les problèmes que nous avons identifiés afin d'atteindre ces objectifs, puis une présentation des différents travaux réalisés au cours de cette thèse sera effectuée.

1.9.1. Objectifs de la thèse

L'objectif de mon travail de thèse a consisté en l'étude de l'intégration de fonctions de détection à la biopuce. Si le travail précédemment réalisé au laboratoire a conduit à simplifier considérablement la configuration optique, nous souhaitons poursuivre dans cette voie en étudiant les possibilités d'intégration de sources de lumière et de détecteurs pour assurer respectivement l'excitation de la fluorescence et la mesure du flux émis. Les avantages associés à cette intégration sont :

- l'amélioration de la compacité de l'instrument,
- la suppression des désalignements potentiels des sources et des plots, en particulier lors des transports de l'appareil, ce qui doit permettre d'augmenter la robustesse instrumentale,
- la possibilité d'augmenter le nombre de plots sur la puce et d'ajuster la forme de ceux-ci sans avoir à modifier l'instrument de mesure.

Ce dernier point est particulièrement intéressant. En effet, il est difficile d'anticiper sur le nombre d'agents à détecter dans le futur avec un même instrument. Pouvoir ajouter un paramètre de détection sans avoir à rapatrier, pour une mise à jour, un grand nombre d'instruments est un avantage important par rapport à des systèmes plus figés comme ceux existants actuellement (voir par exemple Tschmelak 2005).

La figure suivante illustre une biopuce intégrant dans un même dispositif les sources d'excitation, les plots biologiques, le détecteur et la chambre de réaction.

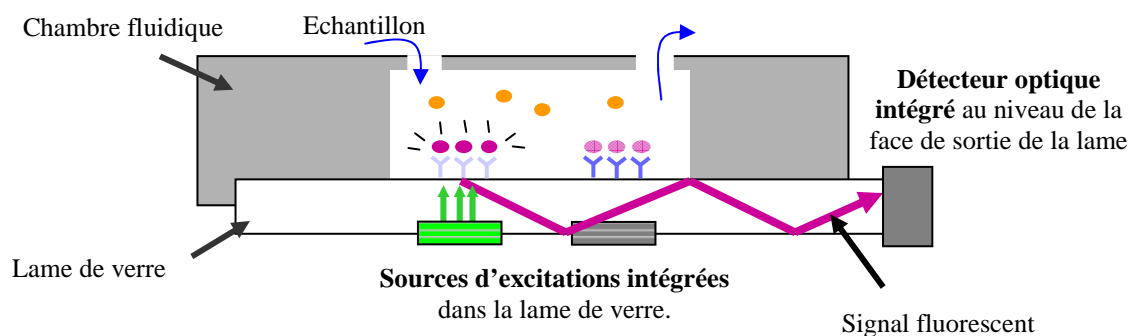


Figure 1.28. Schéma du principe de l'intégration de la chaîne de détection directement dans le composant de notre instrument.

Ce type de dispositif est jeté après chaque analyse : le coût du composant est donc un élément important extrêmement difficile à appréhender dans un contexte de recherche. Certaines grandes règles peuvent cependant être utilisées pour orienter les choix techniques.

L'intégration du détecteur ne nous paraît pas envisageable pour des mesures en fluorescence compte tenu des niveaux de sensibilité des applications visées. Pour ce type de performances, un photomultiplicateur ou une matrice CCD refroidie est nécessaire. En effet, si nous suivons le raisonnement mené par l'équipe de S. Quake (Unger 1999), nous trouvons qu'une seule molécule de Rhodamine placée sur une surface de 1 mm^2 éclairée par un flux de 1 mW émet en retour un flux de l'ordre de la dizaine d'aW ($\sim 50 \cdot 10^{-18} \text{ W}$). Pour une densité de 1 molécule / μm^2 (limite de détection de l'appareil actuel), le flux mesuré est de quelques dizaines de pW ($\sim 50 \cdot 10^{-12} \text{ W}$) ce qui est très faible. De plus, placer un détecteur en bout de lame ne nous paraît pas facilement réalisable.

L'excitation étant normale à la surface de la lame support, il est possible d'utiliser la face opposée à celle comportant les plots (que nous désignerons par « face arrière ») pour y placer des sources optiques remplaçant les LED discrètes. S'il est possible de réaliser des émetteurs semi-conducteurs pour ce genre d'application (Misiakos 2004, Rebhore 2005), nous avons choisi d'étudier une technologie de sources organiques appelées « OLED » pour « Organic Light Emitting Device ». En effet :

- les sources OLED présentent une relative simplicité structurelle vis-à-vis des sources inorganiques de type LED, les rendant plus adaptées à la réalisation de dispositifs jetables (coût de production potentiellement plus faible) (voir Figure 1.29),

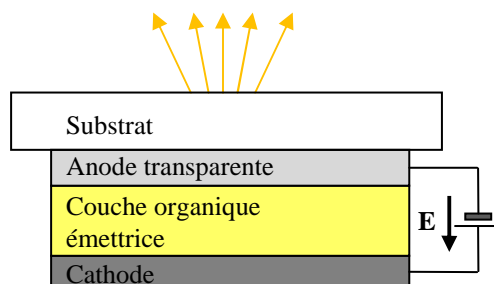


Figure 1.29. Schéma représentant une OLED constituée d'une seule couche mince organique comprise entre deux électrodes qui est la structure d'OLED la plus simple possible.

- ces sources peuvent être réalisées aussi bien sur des substrats en verre, support actuellement utilisé, que sur des substrats en plastique qui peuvent être envisagés à terme pour la réalisation de composants bas coût et jetables (possibilité de façonnage par des techniques de type moulage ou thermoformage),
- la technologie OLED a connu dernièrement un essor rapide et arrive aujourd'hui à un niveau maturité permettant des productions industrielles : des produits à base d'OLED sont aujourd'hui commercialisés (écran de téléphones portables, d'autoradio et plus récemment des écrans de télévision de grandes tailles). Elles présentent aujourd'hui des durées de vie tout à fait acceptables pour nos applications,
- ces sources organiques peuvent être réalisées sur des grandes surfaces et avec des formes complexes (Pardo 2000), ce qui ne nous paraît pas envisageable avec des sources inorganiques de type LED qui sont intrinsèquement ponctuelles,
- il est possible de réaliser des OLED sur l'ensemble du spectre visible (de l'ultraviolet au rouge (Qiu 2001, Adachi 1990, Tang 1987, Braun 1991) et d'ajuster facilement l'intervalle spectral d'émission (Han 2005, Lin 2006),
- la consommation énergétique de ces sources est très faible ce qui est important pour l'autonomie du système.

Toutefois, la présence de sources sur la face arrière de la biopuce peut engendrer des pertes lors du guidage de la lumière émise par les plots biologiques. Il est donc nécessaire de tenir compte de cette contrainte. De la même façon, des pertes lors du guidage peuvent être causées par les éléments de la chambre de réaction (joints d'étanchéité, interfaces mécaniques). Une solution pour minimiser ces pertes consiste à confiner le signal dans des guides d'ondes réalisés, par exemple, par dépôt d'une couche mince d'indice de réfraction supérieur à celui de la lame et protégée par une couche neutre au niveau des contacts avec la chambre de réaction. Une telle solution, sans la couche de protection au niveau des contacts avec la chambre fluidique, est représentée ci-dessous :

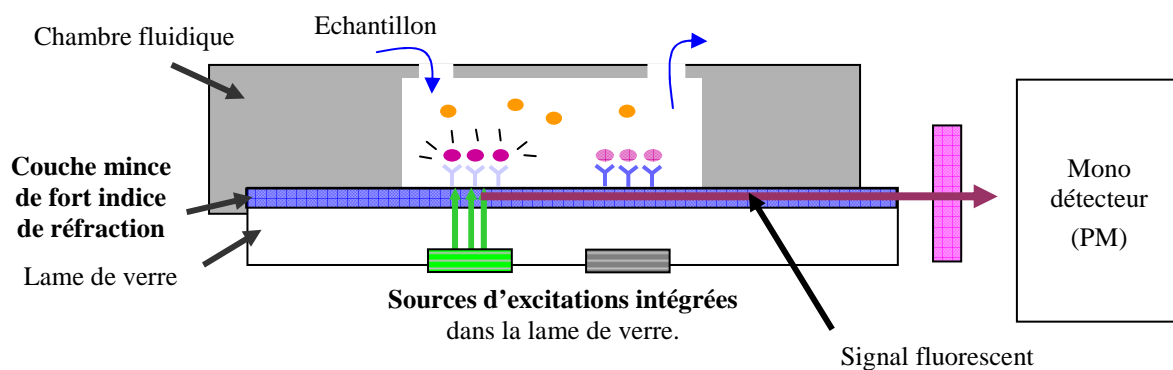


Figure 1.30. Schéma de principe de l'utilisation d'une couche mince diélectrique de fort indice de réfraction afin de confiner le signal de fluorescence sur la surface de la lame et limiter les interactions entre le signal et les structures du composant.

L'objectif du travail de thèse rapporté dans ce mémoire a donc été d'étudier théoriquement et expérimentalement un biocapteur comportant une matrice de sources d'excitation de type OLED intégrées dans son composant et une couche mince diélectrique de fort indice de réfraction destinée à extraire le signal de fluorescence de la biopuce par guidage optique, c'est-à-dire à étudier l'architecture représentée sur la Figure 1.30.

1.9.2. Problèmes identifiés

Le travail de thèse est donc articulé autour de deux problématiques distinctes :

- les propriétés d'émission des sources organiques pour l'excitation de zones fluorescentes précises,
- l'émission de lumière de molécules fluorescentes au voisinage d'interfaces entre différents milieux ainsi que le confinement et la propagation de cette lumière dans une couche mince diélectrique.

1.9.2.1. Propriétés d'émission de sources organiques de type OLED

L'utilisation de la fluorescence comme méthode de transduction impose une sélection précise des intervalles spectraux d'excitation et d'émission. De plus, la méthode de mesure utilisée nécessite un éclairage précis des différents plots biologiques. Il est donc nécessaire d'adapter les propriétés d'émission des OLED à ces contraintes pour leur intégration dans la biopuce.

Largeur spectrale d'émission des sources OLED

Le rendement de conversion du processus de fluorescence à la base de notre biopuce est très faible. Il est donc indispensable d'éliminer tout signal optique autre que celui de fluorescence par filtrage spectral de l'émission des fluorophores. Ceci est d'autant plus critique que le décalage de Stokes entre les domaines d'absorption et d'émission des fluorophores organiques est très faible (voir Figure 1.31 a) et que le spectre d'émission des OLED est large (voir Figure 1.31 b). Pour donner un ordre de grandeur, une combinaison de trois filtres est installée sur l'instrument actuel (un filtre interférentiel en excitation, un filtre interférentiel et un coloré en émission). On obtient ainsi un taux de réjection du signal d'excitation 10^{-8} à 10^{-9} au niveau du détecteur. Le détecteur étant extérieur à la biopuce, celui-ci sera équipé des filtres adaptés. En revanche, il sera nécessaire de filtrer de façon efficace l'émission des OLED pour atténuer l'énergie émise par la source d'excitation dans l'intervalle de transmission des filtres en émission situés devant le détecteur (voir Figure 1.31 b).

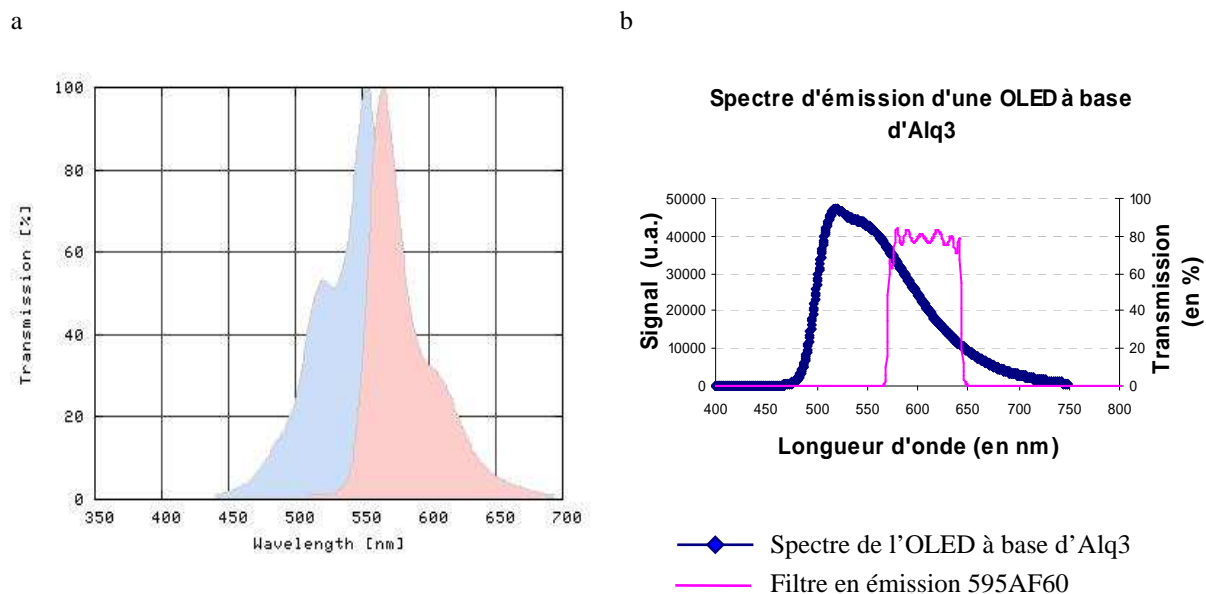


Figure 1.31. a : Spectre d'absorption (en bleu) et d'émission (en rose) des fluorophores Cy3 (données tirées du site www.omegafilters.com/curvo2/). b : Spectre d'émission d'une OLED à base du matériau Alq3 (mesure effectuée au laboratoire).

La largeur spectrale d'émission des sources OLED est un paramètre critique : nous avons donc étudié les moyens de filtrer cette émission et nous rapporterons dans la suite du mémoire les résultats de cette étude.

Directivité des sources OLED

Le dispositif que nous avons développé utilise un balayage discret des différents plots biologiques afin de pouvoir détecter plusieurs agents pathogènes sur une même lame. En excitant tour à tour chacun des plots, il devient en effet possible de mesurer spécifiquement le signal de fluorescence de chacune des zones sensibles et donc de remonter à la présence des agents pathogènes éventuellement présents dans l'échantillon.

Cependant, cela n'est possible que si chaque source d'excitation excite un seul plot à la fois. Dans le cas contraire, il devient très difficile, voire impossible, de discriminer le signal de fluorescence du plot (voir Figure 1.32).

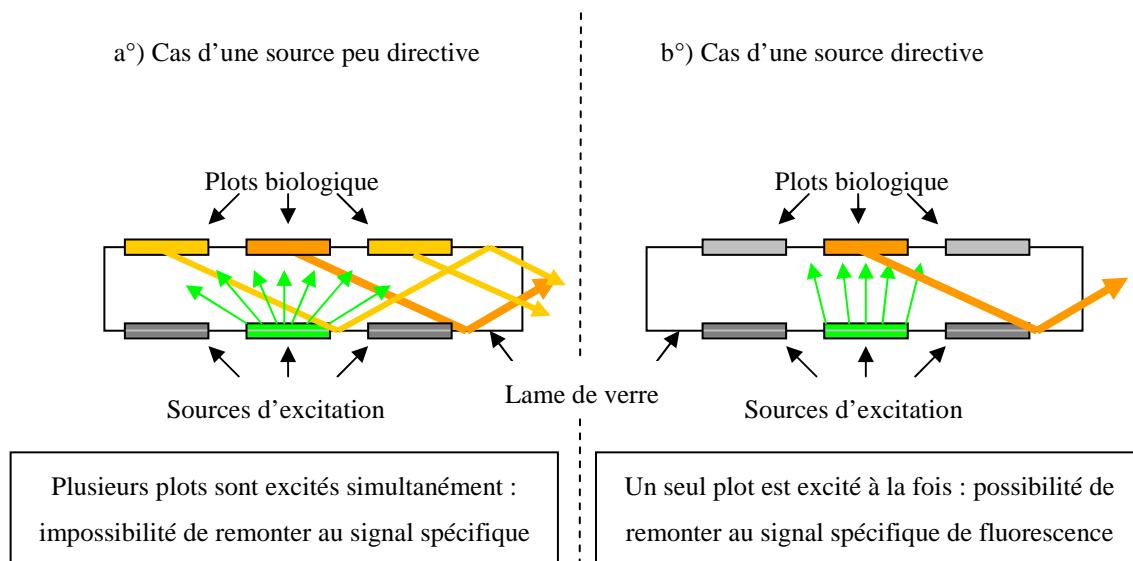


Figure 1.32. a°) Cas de l'excitation des plots biologiques avec des sources peu directives. b°) cas de l'excitation à l'aide de sources directives.

Les OLED ont une directivité très faible comme l'illustre la Figure 1.33. Cela en fait des sources très intéressantes pour le domaine de l'affichage pour leur grand angle de vision mais cette propriété constitue un défaut majeur pour notre application.

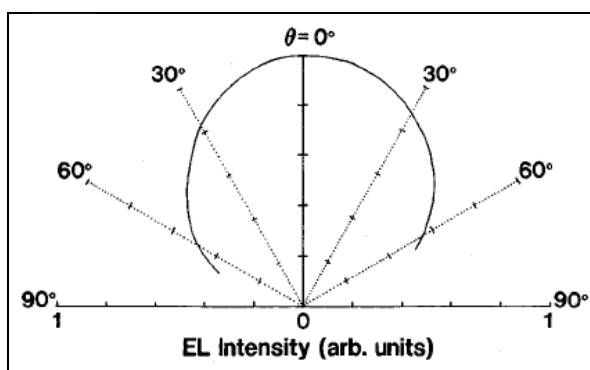


Figure 1.33. Diagramme d'émission d'une source OLED à base du matériau Alq3 (d'après Tsutsui 1994).

Si les sources d'excitation sont très peu directives, une partie de leur émission est émise avec un angle supérieur à l'angle limite de réflexion totale puis est guidée jusqu'au détecteur (Figure 1.34) : le signal d'offset, malgré le filtrage, réduit la sensibilité du dispositif.

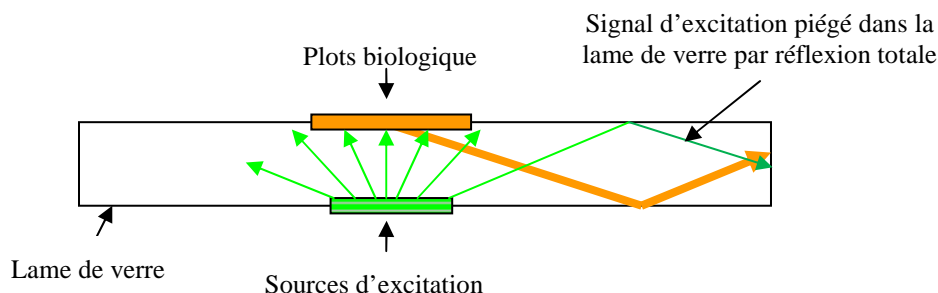


Figure 1.34. Illustration de la possibilité de couplage par réflexion totale de l'émission de la source d'excitation dans la lame de verre dans le cas d'une émission très peu directive.

Une analyse de l'influence de la faible directivité des OLED sur les performances de l'instrument développé au laboratoire doit donc être effectuée. Un travail théorique et expérimental sur l'optimisation de la directivité de ces sources organiques a ensuite été mené pour proposer des solutions en vue de leur intégration dans le composant

1.9.2.2. Collection et confinement du signal de fluorescence dans une couche mince de fort indice de réfraction

Le couplage en champ proche de l'émission de fluorophores dans un matériau massif recouvert ou non d'une ou plusieurs couches minces a fait de l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales (Drexhage 1974, Lukosz 1977 a, Lukosz 1977 b, Chance 1978, Lukosz 1979, Ford 1984, Hellen 1987, Barnes 1998). L'utilisation de guides d'onde afin de confiner le signal de fluorescence de plots biologiques et de leur adresser à chacun un détecteur dédié a, par ailleurs, déjà été étudié (Gachet 2004, Seiler 2006).

Toutefois, les conditions de mesures propres à nos applications nécessitent de bien comprendre ce phénomène afin de dimensionner le système. De plus, il peut être utile de modifier la configuration du système en fonction des conditions expérimentales qui peuvent varier (longueur d'onde de fluorescence, indice de réfraction des milieux, type de milieux) afin d'en optimiser les performances. La connaissance et la maîtrise du couplage en champ proche de la fluorescence dans un guide d'onde nous sont donc nécessaires pour l'optimisation de notre système.

1.9.2.3. Problèmes identifiés – conclusion

L'étude de l'intégration des sources d'excitation dans notre composant nécessite donc de connaître et de pouvoir simuler les propriétés d'émission des OLED ainsi que le couplage et le guidage de la fluorescence dans une lame de verre recouverte ou non d'une couche mince. Cela permettra de concevoir le biocapteur en réduisant le nombre d'étapes de réalisation et d'expériences pour sa mise au point.

De plus, au-delà de mon travail de thèse, ces outils de simulation permettront de modéliser des configurations adaptées à des contextes d'usages non connus aujourd'hui.

1.9.3. Travail réalisé au cours de la thèse

Le travail réalisé au cours de cette thèse est donc articulé autour de l'étude théorique et expérimentale de ces deux fonctions du lecteur de fluorescence développé au laboratoire.

Le chapitre 2 sera consacré à la mise en place de modèles théoriques qui m'ont permis d'étudier ces deux fonctions. Une analyse de ces deux problèmes m'amènera, dans un premier temps, à définir une structure de cavité asymétrique permettant de décrire à la fois les propriétés de collecte de la fluorescence par le composant ainsi que les propriétés d'émission des sources OLED.

Une analyse de l'influence de la faible directivité et du spectre large des OLED sur les performances de l'instrument développé au laboratoire sera ensuite réalisée. Cette étude permettra de définir les besoins en termes de filtrage et de directivité de ces sources en vue de leur intégration dans le composant de la biopuce.

A partir des données disponibles dans la littérature, plusieurs modèles de calcul permettant de simuler à la fois l'émission des OLED et le couplage de la fluorescence dans une lame de verre stratifiée ou non seront ensuite mis au point. Ces différents modèles, complémentaires entre eux, me permettront d'étudier à la fois de la répartition spatiale de l'émission du dipôle dans différentes configurations mais aussi de connaître les différentes voies de relaxation du dipôle, en particulier les dissipations non radiatives et dans les éventuelles modes guidés supportés par la structure du composant. Une étude comparative de performances théoriques de notre instrument vis-à-vis des instruments présentés au paragraphe 1.8.4 sera alors possible et réalisée.

Le chapitre 3 sera, quant à lui, dédié à la caractérisation, théorique et expérimentale, de la collecte de la fluorescence dans le composant et des propriétés d'émission de sources organiques situées ou non dans une cavité Fabry Péro. t.

Grâce aux modèles mis au point au chapitre 2 et à des composants réalisés en collaboration avec différents partenaires, je montrerai le rôle et l'intérêt d'utiliser une couche mince de fort indice de réfraction sur la surface de la lame afin d'améliorer les performances de l'instrument développé au laboratoire. Cela me conduira à une conclusion inattendue au vue des différents systèmes utilisant des guides d'onde pour collecter le signal de fluorescence de plots biologiques.

Enfin, j'effectuerai une analyse théorique et expérimentale des propriétés d'émission de source OLED à l'intérieur de cavités Fabry Péro. t grâce à la réalisation de divers composants. Cette étude me permettra alors de conclure quant à la possibilité d'intégrer de telles sources dans le composant de l'instrument développé au laboratoire

Chapitre 2. Propriétés d'émission d'un dipôle dans une cavité fermée asymétrique

2.1. Introduction

Le travail présenté dans ce chapitre a pour but d'établir un modèle commun permettant d'étudier à la fois les propriétés d'émission d'une OLED ainsi que la collecte et le confinement d'un signal de fluorescence dans un substrat stratifié. Pour cela, nous allons montrer la forte analogie entre ces deux problèmes, analogie qui nous a amené à définir une configuration commune pour l'étude de ces deux phénomènes : les cavités fermées asymétriques.

2.1.1. Structure d'une OLED

Une OLED est une source de lumière dont les émetteurs sont des matériaux organiques excités par un champ électrique externe. Ce champ électrique permet l'injection de porteurs de charges (électrons et trous) à l'intérieur des couches organiques, porteurs qui, en se recombinant, permettent l'émission de lumière : c'est le principe de l'électroluminescence présenté par Destriau dès 1936 (Destriau 1936).

Les OLED sont réalisées à partir d'un empilement de différentes couches minces organiques de dimensions allant de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres. Ces couches minces sont comprises entre deux électrodes réalisant l'injection des porteurs de charges et dont au moins une est transparente afin d'extraire la lumière émise (voir Figure 2.1).

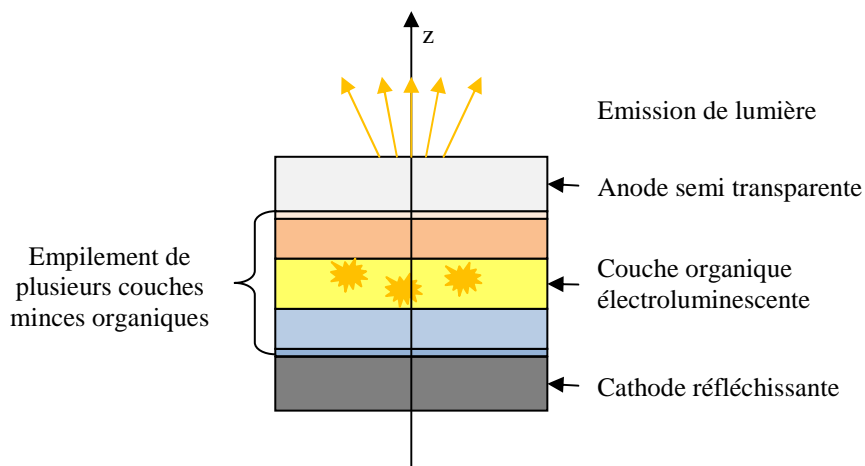


Figure 2.1. Structure typique d'une OLED constituée par un empilement de plusieurs couches minces organiques comprises entre deux électrodes (l'anode et la cathode) responsables de l'injection des porteurs de charges dans les couches organiques et dont au moins une est semi transparente afin de permettre l'extraction de la lumière.

Une OLED peut donc être représentée par un empilement de plusieurs couches minces d'indice de réfraction et d'épaisseur variable au centre desquelles sont positionnées les molécules électroluminescentes responsables de l'émission de la lumière. Une présentation du fonctionnement des OLED sera effectuée au paragraphe 2.3.1 et permettra d'expliquer la raison d'un tel empilement.

La modélisation des propriétés d'émission de ces sources peut alors être réalisée en étudiant les propriétés d'émission de molécules électroluminescentes placées à l'intérieur d'un empilement de différentes couches minces dont les propriétés optiques varient. Les interactions entre le champ électromagnétique produit par les molécules électroluminescentes et les différentes interfaces et milieux composant l'OLED vont déterminer les propriétés spectrale et spatiale d'émission de la source. Ces interactions peuvent être étudiées grâce aux équations de Maxwell permettant de très bien décrire la propagation et les modifications d'un champ électromagnétique traversant un empilement de couches minces.

2.1.2. Collecte de la fluorescence dans un substrat stratifié

Le principe de l'instrument mis au point au laboratoire repose, quant à lui, sur le couplage en champ proche du signal de fluorescence des plots biologiques dans une lame de verre. Ce couplage est observé lorsque le fluorophore est situé à une altitude inférieure ou égale à sa longueur d'onde d'émission. Le substrat peut être composé d'un empilement d'une ou plusieurs couches minces déposées sur un milieu massif (voir Figure 2.2) : on parlera dans ce cas de substrat stratifié.

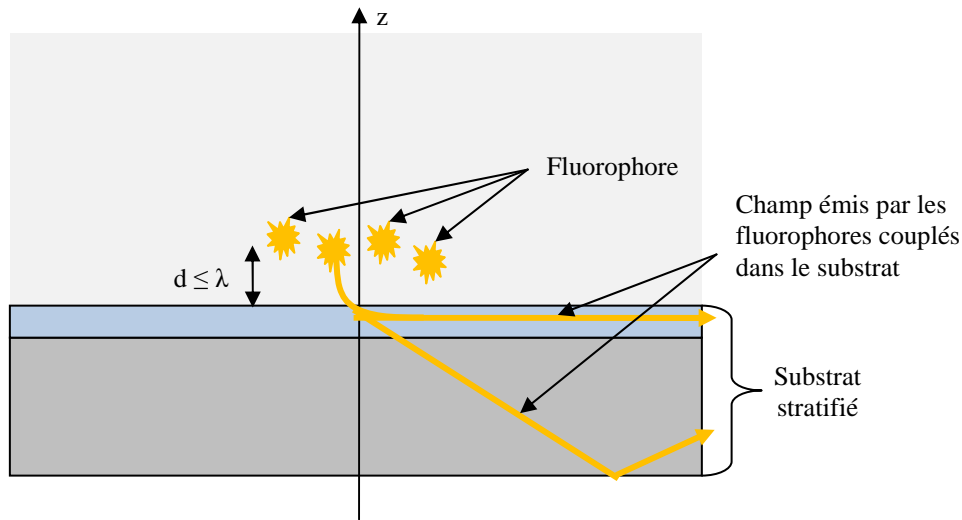


Figure 2.2. Schéma illustrant le principe de la collecte du signal émis par des fluorophores et couplage en champ proche dans un substrat stratifié

L'étude des interactions et de la propagation du champ électromagnétique émis par les fluorophore en fonction des différents milieux composant le substrat doit permettre de modéliser ce phénomène de couplage en champ proche et ainsi de déterminer la quantité d'énergie couplée dans le substrat suivant sa nature et sa structure. On retrouve ici une configuration planaire similaire à l'empilement de couches minces d'une OLED que les équations de Maxwell décrivent très bien.

2.1.3. Cavité fermée asymétrique (définition)

Les structures schématisées sur les Figure 2.1 et Figure 2.2 présentent de fortes similitudes. En effet, dans ces deux configurations, des molécules lumineuses (fluorophores ou molécules électroluminescentes) sont placées à l'intérieur de cavités planaires dont un des miroirs est soit présent (cas de la Figure 2.1), soit absent (cas de la Figure 2.2).

Afin de modéliser à la fois les propriétés d'émission des OLED, la collecte et le confinement du signal de fluorescence dans le composant, nous avons choisi d'étudier l'effet d'une cavité asymétrique sur les propriétés d'émission de ces molécules. Une telle cavité asymétrique peut être représentée de la manière suivante :

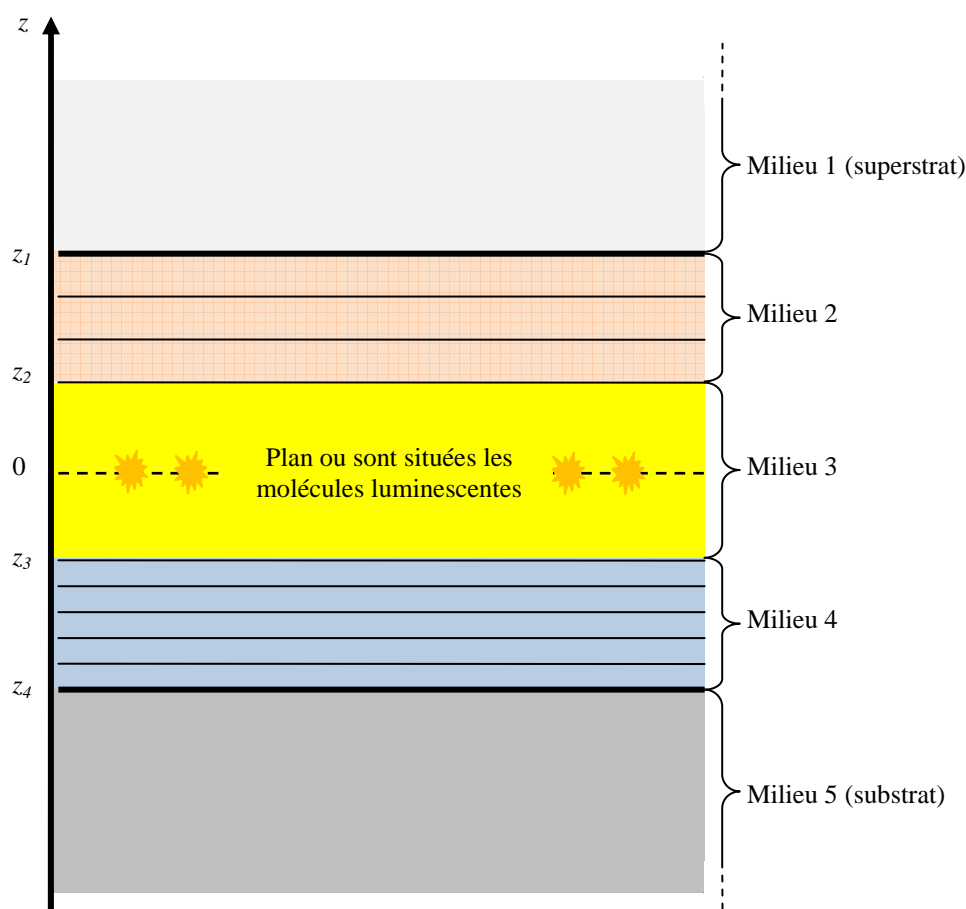


Figure 2.3. Schéma d'une cavité asymétrique à l'intérieur de laquelle sont placées des molécules lumineuses. On considérera dans un premier temps que ces molécules sont positionnées au niveau d'un plan infiniment mince qui sera aussi l'origine de l'axe z . Les différents milieux composant cette cavité peuvent être tous différents de part leur nature et leur propriété optique (métal, couche mince diélectrique, eau, air, ...) afin de pouvoir modéliser les deux configurations représentées sur les Figure 2.1 et Figure 2.2.

Une telle cavité nous permet de modéliser :

- les propriétés d'émission des OLED. Dans ce cas, le milieu 3 représentera la couche organique luminescente dans laquelle les molécules électroluminescentes émettent de la lumière. Les milieux 2 et 4 représenteront les différentes couches minces diélectriques et les électrodes composant l'OLED. Enfin, les milieux 1 et 5 seront les milieux entourant l'OLED, c'est-à-dire du verre ou du plastique pour le substrat et de l'air ou de l'eau pour le superstrat,
- le phénomène de couplage en champ proche. Dans ce cas le substrat (milieu 5) représentera la lame de verre recouvert par une ou plusieurs couches minces représentées par le milieu 4. Les milieux 1, 2 et 3 seront, quant à eux, confondus et représenteront le milieu dans lequel se trouvent les fluorophores (typiquement de l'air ou de l'eau).

Une cavité asymétrique permet de modéliser les deux configurations qui nous intéressent et que nous nous proposons d'étudier dans ce mémoire. Nous développerons alors un seul modèle basé sur cette structure et de simples modifications des propriétés des différents milieux nous permettront d'étudier soit l'émission d'une OLED, soit la collection d'un signal de fluorescence dans un substrat stratifié.

Les équations de Maxwell utilisées pour modéliser ce type de structures planaires via une approche classique de l'électromagnétisme, permettent aussi de modéliser l'émission des différentes molécules lumineuses en considérant que celles-ci sont des dipôles. Cette approche, qui sera justifiée dans le paragraphe suivant, permet en effet de modéliser aussi bien les phénomènes d'absorption que d'émission des molécules.

2.2. Le modèle dipolaire

2.2.1. Présentation du modèle dipolaire

Nous étudierons tout au long de ce mémoire deux interactions lumière-matière très similaires : la photoluminescence et l'électroluminescence. Ces deux phénomènes correspondent à la propriété qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière quand elles sont soumises au rayonnement d'un champ exciteur extérieur pouvant être de nature électrique (électroluminescence) ou optique (photoluminescence). Etant donné qu'on s'intéressera principalement aux propriétés d'émission de ces molécules et plus rarement à leurs propriétés d'excitation que nous n'avons pas pu observer expérimentalement, nous pourrions souvent les assimiler à un seul groupe de molécules que nous nommerons "luminophore".

Les luminophores représentent aussi bien les fluorophores, qui sont utilisés comme marqueurs dans de nombreux biocapteurs dont le notre, que les molécules électroluminescentes utilisées dans les sources de type LEDs ou OLEDs. Le modèle dipolaire électromagnétique permet de simuler les propriétés d'excitation et d'émission de l'ensemble de ces luminophores. En effet, l'approximation dipolaire est valable lorsque les dimensions de la source considérée sont très faibles devant la longueur d'onde d'émission. Les sources considérées ici étant des molécules et leurs émissions se faisant dans le domaine visible, cette approximation est applicable.

Ce modèle dipolaire a déjà été largement utilisé et validé dans la littérature pour décrire les propriétés optiques des luminophores, que ce soit pour simuler des phénomènes de fluorescence (Chance 1975, Chance 1978, Lukosz 1979, Ford 1984, Hellen 1987, Barnes 1998, Barritault 2002) que pour étudier les propriétés d'émission de sources électroluminescentes à l'intérieur de cavités (Lukosz 1980, Lukosz 1981, Björk 1991, Deppe 1991 a, Deppe 1991 b, Deppe 1994, Rigneault 1996, Neyts 1998, Benisty 1998 a). Aucun modèle publié ne permet de traiter le cas d'une cavité dissymétrique permettant de passer, par un simple paramétrage, d'une situation à l'autre.

Dans ce modèle, le luminophore est modélisé par deux dipôles oscillants électromagnétiques :

- un dipôle d'absorption qui permet de prendre en compte l'excitation du luminophore par le champ exciteur. Ce modèle permet de simuler les différents phénomènes lors de l'excitation d'un luminophore que ce soit l'intensité du champ d'excitation que l'effet de son orientation par rapport à celle du luminophore. En effet, suivant la nature du champ exciteur et de la position du dipôle, ce dernier sera plus ou moins excité (voir § 2.2.2.2). De même, suivant son orientation vis-à-vis de la polarisation du champ d'excitation, le dipôle pourra être excité ou non. Ce phénomène est souvent appelé le "principe de photo-sélection" : si la direction de polarisation du champ exciteur est orthogonale à la direction du dipôle (déterminée par l'orientation moléculaire du luminophore par rapport au champ), ce dernier n'aura pas d'interaction avec le champ exciteur et donc ne pourra pas absorber d'énergie (Ruiter 1997),

- un dipôle d'émission qui permet de modéliser le phénomène d'émission de lumière du luminophore. Dans ce cas, l'électron qui passe de l'état excité à l'état fondamental se comporte comme un dipôle oscillant électromagnétique irradiant de l'énergie.

Ces deux dipôles ne sont pas nécessairement confondus. La conformation de la molécule peut changer entre le moment où la molécule absorbe de l'énergie et le moment où elle émet un photon. En effet, la molécule vibre naturellement avec des temps moyens de 10^{-12} secondes alors que les temps moyens d'émission d'un photon sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} secondes autorisant un changement d'orientation et de position entre l'évènement d'absorption d'énergie et celui d'émission d'un photon. Il faudra donc considérer deux dipôles oscillant d'orientations différentes lorsque l'on prendra en compte les phénomènes d'absorption et les phénomènes d'émission.

2.2.2. Effets du milieu extérieur

Le but de ce paragraphe est de décrire qualitativement les effets que peuvent avoir le milieu extérieur, ou plus précisément les champs radiatifs supportés par le milieu extérieur, sur les propriétés d'absorption et d'émission d'un dipôle. En effet, on ne peut considérer les propriétés d'émission d'un dipôle sans prendre en compte le milieu dans lequel il est placé.

Pour cela, nous allons tout d'abord reprendre une analogie décrite par Fermi (Fermi 1932) afin de se représenter comment le milieu extérieur peut influencer sur les propriétés d'émission d'un dipôle.

L'analogie décrite par Fermi utilise des concepts de mécanique afin de décrire les interactions entre un dipôle et son environnement extérieur. Bien qu'elle ne permette pas de représenter l'ensemble des phénomènes qui influent sur les propriétés d'absorption et d'émission d'un dipôle, cette analogie donne une représentation simple de l'influence du milieu extérieur sur un dipôle. Dans cette analogie on représente (voir Figure 2.4) :

- le dipôle oscillant par un pendule de masse M . La période d'oscillation du pendule correspond à la longueur d'onde d'absorption ou d'émission du dipôle. On note que dans cette analogie, on considère indépendamment les phénomènes d'absorption et d'émission du dipôle. Par exemple, les pertes d'énergie interne au dipôle entre l'absorption et l'émission d'un photon (induisant le décalage de Stokes) ne sont pas prises en compte,
- le milieu extérieur ou plus exactement les différents champs électromagnétiques pouvant se propager dans ce milieu par un ressort. Ce ressort, de part ces différentes périodes d'oscillation, représente les champs propagatifs du milieu dans lequel est situé le dipôle. On parle aussi de densité de modes photoniques (voir § 2.2.2.3). Ces périodes d'oscillation peuvent former un continuum (cas d'un dipôle dans un milieu infini) ou bien être discrètes (cas d'un dipôle situé dans un guide d'onde par exemple),
- les interactions entre le dipôle et son environnement par un élastique reliant la masse M du pendule au ressort.

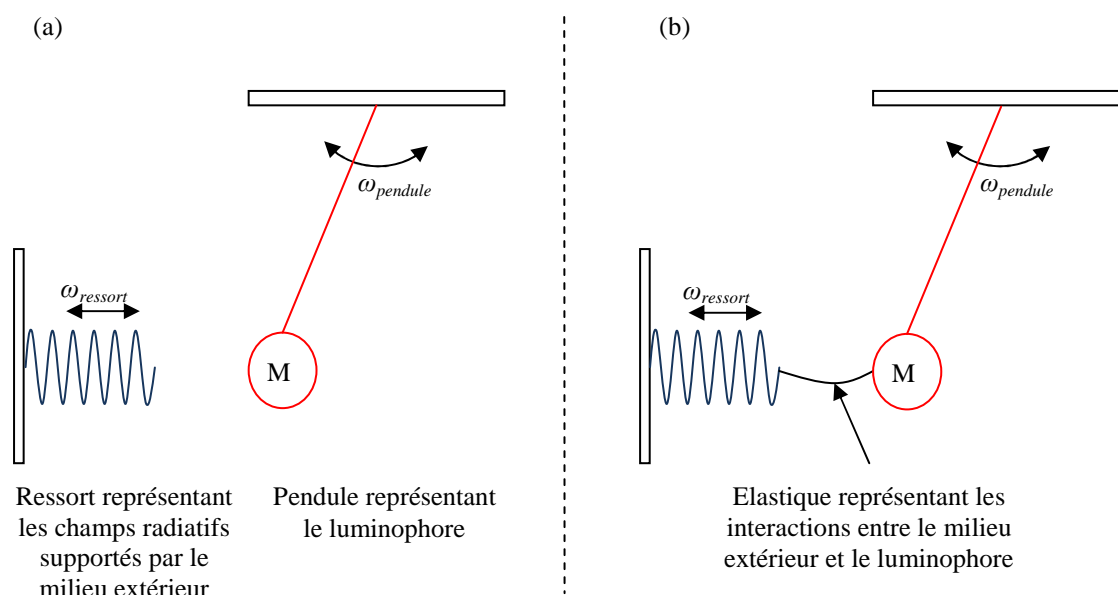


Figure 2.4. Schéma illustrant le modèle permettant de se représenter les interactions entre un luminophore, schématisé ici par un pendule de masse M , et son environnement extérieur dont les champs radiatifs sont représentés par un ressort. Les interactions entre le luminophore et le milieu extérieur sont alors représentées par un élastique entre le ressort et le pendule.

Le système dipôle-milieu extérieur forme donc un système unique dont l'énergie est la somme de :

- l'énergie du dipôle,
- l'énergie électromagnétique des champs radiatifs contenus dans le milieu extérieur,
- l'énergie provenant des interactions entre le dipôle et le milieu extérieur.

Les interactions entre la molécule et la densité de modes photoniques du milieu extérieur sont représentées dans cette analogie par un élastique reliant le pendule au ressort. Cet élastique perturbe légèrement le mouvement du ressort et du pendule. Considérons, par exemple, qu'à l'instant $t = 0$ le pendule est en oscillation et que le ressort est au repos. A chaque oscillation le pendule transmet au ressort de faibles forces ayant la même période que celle du pendule. Si cette période est différente des périodes d'oscillations possibles du ressort, les mouvements de ce dernier restent faibles. Par contre, si ces périodes correspondent, le mouvement s'amplifie fortement ce qui représente l'émission d'un photon dans un des champs supportés par le milieu extérieur (correspondant à la période d'oscillation du ressort).

Inversement, si à l'instant $t = 0$ le ressort est en oscillation et le pendule au repos, le phénomène inverse se produit. L'amplitude de l'oscillation du pendule produite par le ressort devient importante seulement si la période d'oscillation de ce dernier est suffisamment proche de la période d'oscillation du pendule. Cela représente le phénomène d'absorption d'un photon : il faut que l'énergie du photon absorbé corresponde à une transition électronique des bandes d'énergie du dipôle.

On voit ainsi par ce modèle que des modifications du milieu extérieur capables d'agir sur la densité de modes photoniques, c'est-à-dire de modifier le nombre et la répartition des champs électromagnétiques pouvant se propager dans le milieu extérieur (soit les périodes d'oscillation du ressort), vont influencer sur les propriétés d'absorption et d'émission du dipôle. Ce dernier ne va plus pouvoir osciller selon certaines périodes qui ne sont

plus des périodes d'oscillation du ressort et inversement. Ces modifications du milieu extérieur peuvent par exemple être dues à la présence d'un milieu absorbant ou réfléchissant à proximité du dipôle ou encore à une cavité.

Dans les deux paragraphes qui suivent, nous allons regarder plus en détail quels sont les effets que peuvent avoir une cavité asymétrique (voir Figure 2.3) sur les propriétés d'absorption puis d'émission d'un dipôle situé à l'intérieur.

2.2.2.2. Lors de l'excitation

La cavité asymétrique influe sur le champ d'excitation et donc sur les propriétés d'absorption d'un luminophore.

Cas d'une interface plane

Dans un premier temps, considérons le cas d'une cavité se résumant à une interface plane au dessus de laquelle est positionné un dipôle et d'une excitation de ce dipôle par de la lumière arrivant en incidence normale par rapport à la surface de la cavité. C'est la configuration de l'excitation des plots biologiques fluorescents dans notre instrument (voir Figure 2.2).

Soit une onde plane monochromatique, cohérente et polarisée rectilignement de vecteur d'onde k arrivant en incidence normale par rapport à l'interface (voir Figure 2.5) :

$$\mathbf{E}_{inc} = \mathbf{E}_0 e^{-ikz} e^{i\omega t} \quad \text{Eq. 2.1.}$$

Avec E_0 l'amplitude maximale du champ, k le vecteur d'onde, z la position considérée par rapport à l'interface, ω la pulsation du champ et t le temps.

Le champ réfléchi par l'interface va interférer avec le champ incident produisant une onde stationnaire au dessus de l'interface. Pour rejoindre l'analogie décrite au paragraphe précédent, ces interférences modifient les champs électromagnétiques présents dans le milieu extérieur.

A l'altitude z_0 au dessus de l'interface, le champ total sera la somme du champ incident et du champ réfléchi par l'interface. L'intensité résultante, donc la puissance d'excitation est alors :

$$\|\mathbf{E}_{exi}\|^2(z_0) = \|\mathbf{E}_0\|^2 \left(1 + |r|^2 - 2\Re(r.e^{2ikz_0}) \right) \quad \text{Eq. 2.2.}$$

où r est le coefficient de réflexion de Fresnel (amplitude et phase) de l'onde incidente au niveau de l'interface,

\Re désigne la partie réelle et $\|\mathbf{E}_{exi}\|^2$ est l'intensité d'excitation.

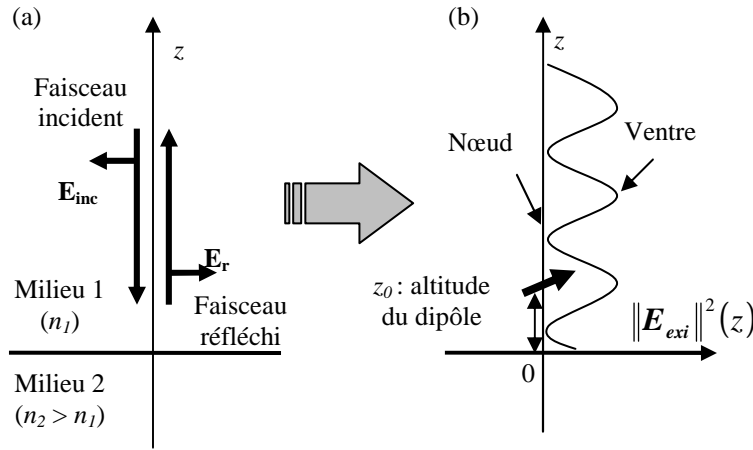


Figure 2.5. Principe de la formation d'une onde stationnaire au-dessus d'une interface. Un champ incident E_{inc} est réfléchi sur l'interface entre les milieux 1 et 2 (a). L'interférence de ces deux champs produit une onde stationnaire dans le milieu 1 (b)

La puissance d'excitation varie donc en fonction de l'altitude z au-dessus de l'interface. On comprend alors que le dipôle ne sera pas excité avec la même force s'il se trouve dans un ventre ou un nœud du signal d'excitation.

Dans le cas d'un substrat stratifié, ce phénomène est plus compliqué mais le principe reste le même : on observe des interférences à la longueur d'onde d'excitation. La valeur de $\|E_{exi}\|^2$ au niveau des fluorophores (quelques nanomètres au-dessus du substrat) dépendra de l'angle et de la polarisation du champ incident mais aussi de la nature des couches constituant le substrat.

La condition pour que cette onde stationnaire se forme au-dessus de l'interface est que la longueur de cohérence de la source soit supérieure aux différentes épaisseurs et longueurs mises en jeu (épaisseurs des couches du milieu 2). C'est le cas si un laser est utilisé pour exciter les fluorophores : la longueur de cohérence, de l'ordre de un à plusieurs dizaines de centimètres, est bien supérieure à la distance des fluorophores à la surface (de quelques dizaines de nm)

Les sources d'excitation que nous utilisons sont des diodes électroluminescentes filtrées par un filtre interférentiel centré sur la longueur d'onde 525 nm et dont la largeur de la bande de transmission est de 45 nm. La longueur de cohérence l_c de ces sources est donc donnée par :

$$l_c = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \quad \text{Eq. 2.3.}$$

où $\Delta\lambda$ représente la largeur spectrale de la source d'émission et λ est la longueur d'onde centrale d'émission de la source.

On calcule que la longueur de cohérence spatiale de la source après filtrage est de l'ordre de 6,1 μm . Il sera donc nécessaire de considérer les interférences créées par la réflexion du faisceau d'excitation sur la lame lors de la modélisation du phénomène d'absorption des fluorophores sur notre dispositif car les dimensions mises en jeu sont toutes inférieures au micromètre.

La difficulté principale est cependant de connaître l'altitude des fluorophores par rapport à l'interface afin

d'estimer ce signal d'excitation. Par exemple, la rugosité des différentes couches permettant de lier les sondes de capture à la surface est mal connue. L'épaisseur de ces couches est difficile à connaître précisément. Enfin, l'orientation des duplexes par rapport à la surface dépend de nombreux paramètres et est peu maîtrisée.

Toutefois, la configuration de notre instrument utilise une excitation provenant de la face inférieure de la lame (voir Figure 2.6).

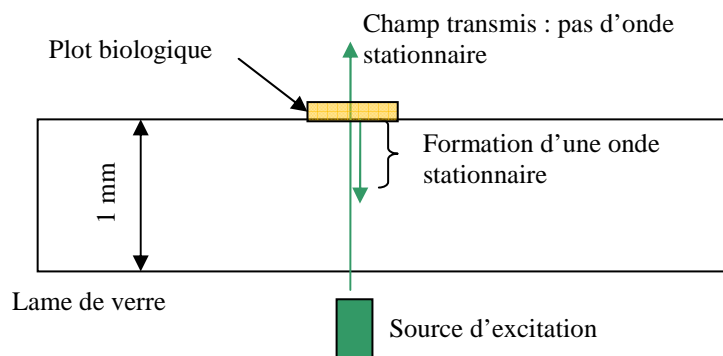


Figure 2.6. Représentation de l'excitation des plots biologiques dans notre instrument. L'excitation étant réalisée par-dessous la lame, il n'y a pas formation d'une onde stationnaire au niveau des plots biologiques.

A l'intérieur de la lame on observe alors la formation d'une onde stationnaire due aux interférences entre le champ direct émis par la source et celui réfléchi sur la face supérieure de la lame. Le champ transmis à travers la lame ne forme par contre pas d'onde stationnaire au dessus de cette dernière car il n'y a pas de champ se propageant dans le sens inverse pour interférer avec. Les fluorophores étant situés au-dessus de la lame ne voient donc pas l'onde stationnaire formée à l'intérieur de la lame mais uniquement le champ transmis. De plus, la source d'excitation est rendue directive par le module d'excitation (voir Figure 1.21). Il est alors possible de considérer la puissance d'excitation des fluorophores comme constante quelles que soient leurs positions au dessus de la lame.

Dans le cas d'une excitation à l'aide de sources intégrées dans la lame, cette approximation peut encore être utilisée. En effet, ces sources d'excitation devront être directives afin de minimiser la formation d'un offset trop important et de n'exciter qu'un seul plot à la fois (voir § 1.9.2.1). Leur puissance d'excitation sera donc aussi quasiment constante selon l'altitude des fluorophores et ce d'autant plus que la distribution en altitude de ces derniers reste faible (< 100 nm).

Nous pourrions donc nous affranchir de l'effet de la formation d'une onde stationnaire pour l'excitation des plots biologiques dans notre cas.

Cas d'une cavité fermée

Considérons à présent le cas d'une cavité fermée (voir Figure 2.7) constituée d'une couche mince luminescente comprise entre deux miroirs (les électrodes des OLED peuvent former une telle cavité). Les OLED étant pompées électriquement, on peut considérer que le champ exciteur est homogène à l'intérieur de la couche luminescente. Cependant, le champ émis par les dipôles à l'intérieur de la cavité forme aussi une onde stationnaire due aux interférences entre les différentes réflexions de ce champ sur les miroirs de la cavité. Cette onde stationnaire influe en retour sur l'émission des dipôles. Suivant la position de ces derniers à l'intérieur de ce

champ (au niveau d'un nœud ou d'un ventre de l'onde stationnaire) leur émission est alors annihilée ou bien renforcée (Dirr 1997 et Figure 2.7).

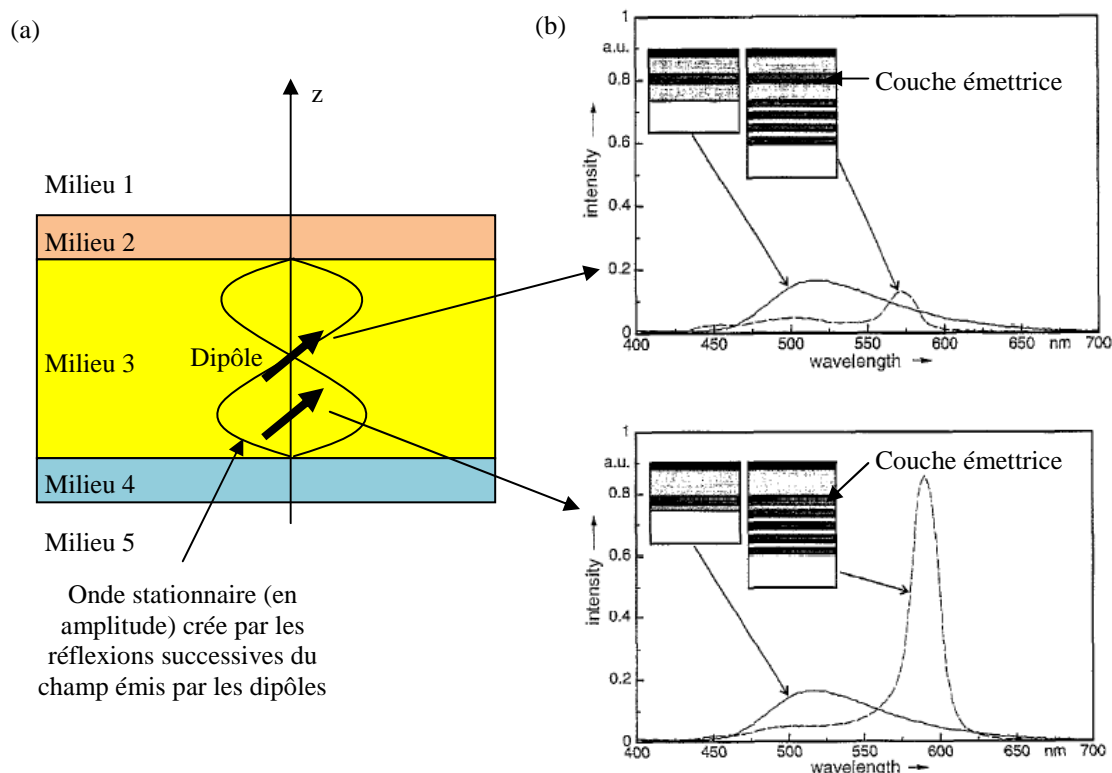


Figure 2.7. (a) : formation d'une onde stationnaire à l'intérieur de la cavité due aux réflexions successives sur les milieux 2 et 4 du champ émis par les dipôles situés à l'intérieur de la cavité. (b) : effet de la position du dipôle vis-à-vis de cette onde stationnaire sur son émission. Si le dipôle se situe dans un ventre de l'onde stationnaire son émission est renforcée et inversement s'il se trouve au niveau d'un nœud de l'onde stationnaire (les figures b sont issues de la publication Dirr 1997).

Cet effet est d'autant plus important dans les cavités que l'onde stationnaire résulte d'interférences multiples contrairement au cas d'une simple interface plane où l'onde stationnaire est créée par l'interférence de deux ondes. Ce renforcement peut par exemple être utilisé afin d'améliorer la puissance d'émission des OLED en utilisant des couches optiquement neutres pour positionner la couche émettrice au niveau d'un ventre de cet onde stationnaire (cas de la Figure 2.7 b).

Il est aussi possible de s'affranchir de cet effet en répartissant les dipôles sur l'ensemble de l'épaisseur de la cavité. L'annihilation et le renforcement de l'émission des dipôles se trouvent alors moyennés. Ce sera le cas des échantillons OLED à l'intérieur de cavités que j'ai eu l'occasion de caractériser au cours de mon travail de thèse.

Remarque : lors d'une excitation optique d'une cavité, il y a aussi formation d'une onde stationnaire à l'intérieur de cette dernière. Il est cependant possible de contourner cet effet en excitant la cavité toujours de la même manière (angle d'incidence et longueur d'onde du faisceau d'excitation). La même onde stationnaire sera alors systématiquement créée permettant de réaliser des comparaisons entre les différentes expériences et échantillons testés à condition que leurs propriétés physique n'aient pas changé (coefficients de réflexion de la cavité, indices de réfraction des différentes couches, ...).

2.2.2.3. Lors de l'émission

La luminescence de molécules fluorescentes ou électroluminescentes est un processus d'émission spontanée. Le luminophore, qui est initialement dans un état excité, va chercher à revenir dans son état de plus basse énergie ou état fondamental. La différence d'énergie entre l'état excité et l'état fondamental est alors évacuée sous la forme d'un photon, mais il est aussi possible qu'elle soit évacuée dans d'autre mode de relaxation de l'énergie (chaleur, vibrations mécaniques,)

A partir de la "règle d'Or" de Fermi, on trouve que la probabilité de transition Γ_{ij} d'une molécule entre un état excité i et son état fondamental j , c'est-à-dire sa probabilité d'émettre un photon, est donnée par (Barnes 1998, Lakowicz 2003). :

$$\Gamma_{ij} \propto |M_{ij}|^2 \rho(v_{ij}) \quad \text{Eq. 2.4.}$$

Où M_{ij} est l'élément de matrice de transition reliant les niveaux i et j déterminés par les fonctions d'onde de ces états respectifs, et $\rho(v_{ij})$ la densité de modes photoniques (PMD) à la fréquence de transition v_{ij} . Etant donné que le terme M_{ij} liant les états i et j est déterminé par leurs fonctions d'ondes respectives dont les distances caractéristiques sont de l'ordre de l'Angström, ce terme peut être considéré comme constant pour des interactions supérieures à cette distance, ce qui est notre cas.

La densité de mode photonique ($\rho(v_{ij})$) représente, quant à elle, les champs radiatifs supportés par le milieu extérieur. Dans l'analogie mécanique présentée précédemment, ce terme correspond aux différentes périodes d'oscillation possibles du ressort. Les différents champs radiatifs supportés par le milieu extérieur, que nous désignerons à présent par le terme "mode", vont alors déterminer les possibilités d'émission d'un photon par le dipôle. On retrouve l'effet du ressort sur les périodes d'oscillation possibles du pendule. Le pendule peut osciller uniquement si sa période d'oscillation correspond à une des périodes d'oscillation du ressort.

Par exemple, si le dipôle est placé à l'intérieur d'une cavité Fabry Péro, les modes supportés par le milieu extérieur vont être différents de ceux d'un dipôle situé dans un milieu infini. Seuls certains couples longueur d'onde / angle d'émission (λ, θ) seront supportés par la structure (ce sont les modes radiatifs de la structure). La présence de la cavité va donc forcer le dipôle à émettre selon certaines longueurs d'onde et certaines directions modifiant ainsi ses propriétés spectrale et spatiale d'émission.

Par la suite nous utiliserons systématiquement le terme "mode" afin de désigner les différentes voies de relaxation de l'énergie d'un dipôle. Ces modes peuvent être :

- radiatifs. Dans ce cas ils correspondent à des couples (λ, θ) selon lesquels le dipôle peut émettre un photon. Ces modes peuvent former un continuum (cas d'un milieu infini) ou bien être discrets (cas d'une structure confinée par exemple un guide d'onde).
- non radiatifs. Dans ce cas les modes peuvent correspondre soit à un angle imaginaire représentatif d'un mode évanescent du dipôle, soit à d'autres formes de relaxation de l'énergie par exemple sous forme de chaleur, de vibrations mécaniques, ...

De nombreuses structures distinctes peuvent être utilisées pour modifier la densité de modes photoniques (PMD) : une simple interface entre deux milieux (Lukosz 1979, Ford 1984, Hellen 1987, Barnes 1998, Barritault 2002), un cristal photonique (Brown 1993) ou encore une micro cavité (Lukosz 1980, Deppe 1991 a, Deppe

1994, Rigneault 1996, Benisty 1998 b, Rigneault 1998).

2.3. Effets et méthodes de modification des propriétés spectrale et spatiale d'émission d'une OLED

Ce paragraphe a pour but de présenter et de justifier le choix de la méthode que nous avons utilisée afin de modifier et adapter à nos contraintes les propriétés spectrale et spatiale d'émission d'une OLED.

Dans un premier temps, nous allons présenter le fonctionnement, le type de structure et les propriétés d'émission des OLED les plus couramment fabriquées aujourd'hui. Une analyse de l'influence de la directivité et du spectre d'émission des OLED sur les performances de l'instrument développé au laboratoire sera alors effectuée afin de justifier le travail qui a été réalisé.

Nous donnerons ensuite quelques unes des solutions présentées dans la littérature afin de modifier et de contrôler les propriétés d'émission de ce type de sources, puis nous justifierons notre choix d'utiliser une cavité planaire de type Fabry Pérot.

2.3.1. Qu'est qu'une OLED ?

2.3.1.1.Principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement d'une OLED, tout comme celui d'une LED (Luminescent Electrical Device), repose sur le phénomène d'électroluminescence.

La première observation du phénomène d'électroluminescence dans de la matière organique a été réalisée par Bernanose et al. en 1953 (Bernanose 1953), puis par Pope et al. en 1963 (Pope 1963) mais ce n'est qu'à partir des travaux des équipes de Saito et Tsutsui et al (Adachi 1989; Adachi 1990) , de Tang et VanSlyke et al. (Tang 1987) et de Friend et al. (Burroughes 1990) que cette technologie c'est réellement développée. En effet, ces travaux ont montré la possibilité de réaliser des OLED par des techniques simples de dépôt sous vide (Adachi 1989; Adachi 1990), ou bien par des méthodes de spin coating (Burroughes 1990) permettant la fabrication de dispositifs OLED montrant de bonnes performances. Depuis, ce domaine est en pleine expansion.

Ce phénomène d'électroluminescence regroupe les différents modes d'émission d'une radiation électromagnétique par une matière condensée soumise à l'excitation d'un champ électrique externe. Généralement, la radiation électromagnétique émise se situe dans le domaine visible du spectre, mais il est aussi possible d'obtenir des radiations dans l'ultra violet et l'infra rouge. Il est généralement admis que ce mécanisme d'électroluminescence dans les OLEDs se décompose en plusieurs étapes (voir Figure 2.8) :

- l'injection des porteurs de charge dans les couches organiques constituant l'OLED,
- leur transport à travers la ou les couches organiques sous forme d'entité de charges appelées polarons (p^+ ou p^-), ou pour simplifier électrons (e^-) et trous (h),
- la recombinaison des porteurs de charges opposées en un état excité neutre appelé exciton,
- et la relaxation de l'exciton sous forme d'émission d'un photon.

Il a été montré par les lois de la mécanique quantique que l'exciton ainsi formé a 25 % de chance d'être dans un état de symétrie singulet (S) et 75 % d'être dans un état de symétrie triplet (T). Seuls les états singulets peuvent

se dé-exciter de façon radiative (Kraft 1998, Kalinowski 1999) et donner lieu à une émission de lumière, ce qui limite le rendement d'électroluminescence. Quelques équipes travaillent actuellement pour dépasser cette limitation par exemple en étudiant l'effet de couplage de spin dans des matériaux phosphorescents (Sun 2006).

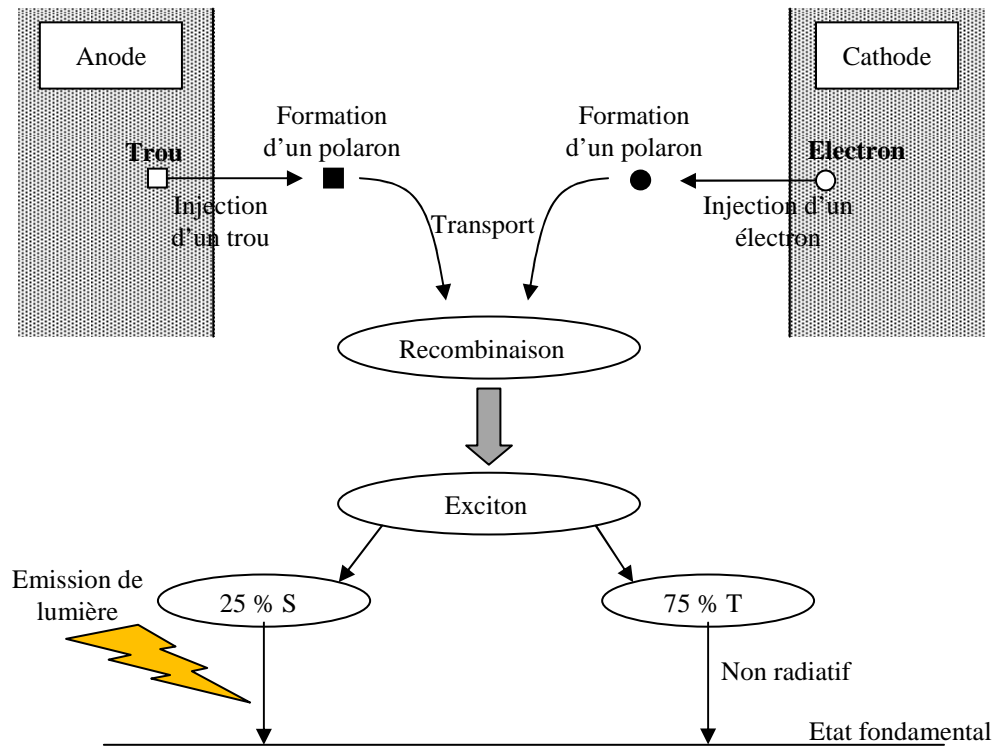


Figure 2.8. Décomposition simplifiée du phénomène d'électroluminescence dans une OLED

2.3.1.2. Structure d'une OLED

De façon simplifiée une OLED est constituée d'une couche de matériau organique électroluminescent comprise entre deux électrodes dont l'une au moins est transparente afin d'extraire la lumière (voir Figure 2.9 a).

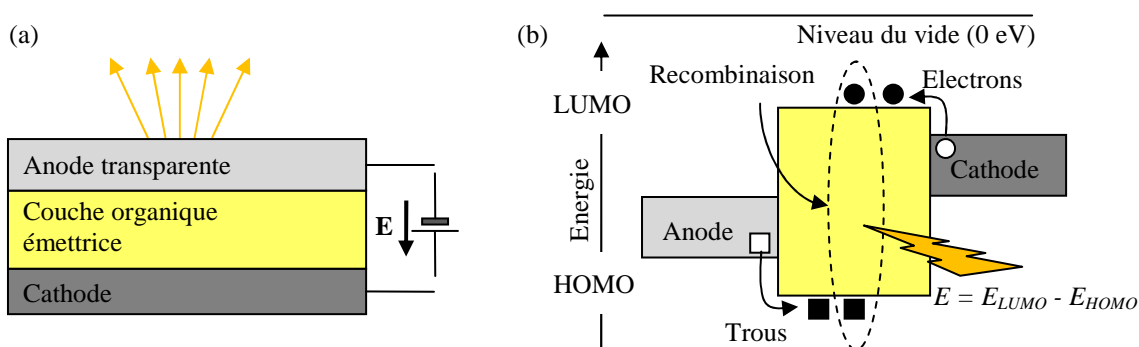


Figure 2.9. A : structure simplifiée d'une OLED constituée d'une couche organique émettrice comprise entre deux électrodes. B : bandes d'énergie associées à la structure de l'OLED : lorsque deux porteurs de charges de signes opposés se rencontrent au niveau de la couche émettrice, ils créent un exciton qui, en se dé-excitant, est capable d'émettre un photon.

L'application d'une différence de potentiel entre les deux électrodes (de l'ordre de quelques Volts) permet l'injection des porteurs de charges (électrons et trous) à l'intérieur de la couche organique qui se déplacent respectivement sur :

- la "bande de conduction" ou LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) de la couche organique,
- la "bande de valence" ou HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) de la couche organique.

Il existe dès lors une certaine probabilité pour qu'un électron et un trou se rencontrent afin de former un exciton. En se dé-excitant, ce dernier peut alors émettre un photon d'une énergie égale à la différence entre les niveaux LUMO et HOMO. Cette différence d'énergie entre ces niveaux, aussi appelée gap, se trouve généralement dans le domaine visible du spectre (voir Figure 2.9 b). Dans le cas contraire, les porteurs de charges sont absorbés par l'électrode opposée et n'induisent aucune émission de lumière.

La structure décrite ci-dessus fonctionne mais avec des rendements très faibles. En effet, à cause de la différence de mobilité des porteurs de charges, la zone de recombinaison se retrouve à proximité de la cathode qui est généralement métallique. Les relaxations non radiatives dans la cathode limitent alors le rendement d'émission de l'OLED (Mitschke 2000).

Une solution pour éviter cet effet est d'utiliser plusieurs couches de matériaux organiques possédant des niveaux énergétiques différents. En les choisissant bien, on peut s'arranger pour établir une "barrière" pour les électrons comme pour les trous au niveau d'une interface entre matériaux différents. Cela crée une zone de recombinaison des porteurs de charges située à mi chemin entre les électrodes (voir Figure 2.10 b). Les pertes non radiatives causées par les électrodes métalliques sont alors minimisées. De plus, en confinant les électrons et les trous dans une zone précise, la probabilité de formation des excitons dans la couche émettrice augmente, optimisant ainsi le rendement de l'OLED.

Il est encore possible de multiplier les couches pour améliorer les performances des OLED comme, par exemple, pour améliorer l'injection des porteurs de charge dans les couches organiques (HIL et EIL) ou encore leur transport (HTL, ETL). Aujourd'hui, les OLED les plus performantes sont réalisées avec une petite dizaine de couches ayant chacune un rôle bien défini (Adachi 1989, Kraft 1998, Friend 1999, Forsythe 2000, Huang 2003, Ruhstaller 2003, Kim 2005, Wu 2006) pour une épaisseur totale de l'ordre de quelques centaines de nanomètres

(voir Figure 2.10 a).

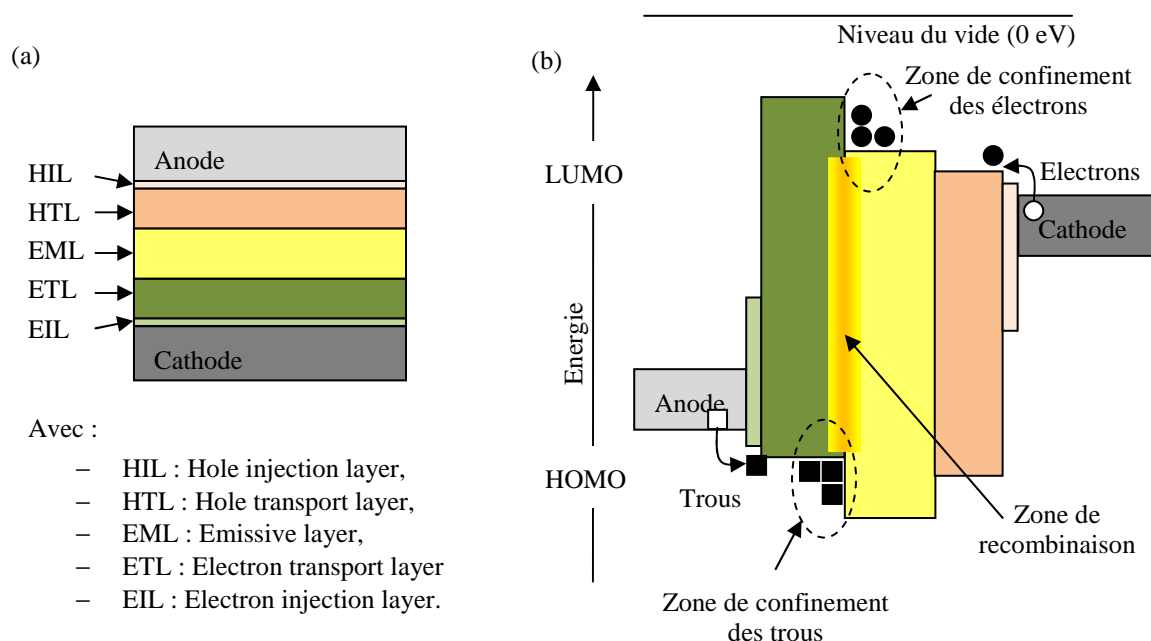


Figure 2.10. a : structure d'une OLED multicouche constituée par un empilement des couches HIL/HTL/EML/ETL/EIL et b : structure des bandes d'énergie de cet empilement. Les électrons injectés par la cathode et les trous injectés par l'anode s'accumulent au niveau de la barrière énergétique formée par les couches EML/HTL formant ainsi une zone de recombinaison située au milieu de la structure au niveau de la couche émettrice.

Les propriétés fondamentales des matériaux organiques utilisés dans les OLED sont leur capacité à accepter les porteurs de charges des électrodes, à transporter ces charges et bien sûr à avoir un bon rendement de luminescence.

Il existe de très nombreux matériaux organiques pouvant être utilisés pour la réalisation des différentes couches composant une OLED et qui émettent sur l'ensemble du spectre visible. Les matériaux organiques les plus utilisés aujourd'hui pour la couche émettrice sont :

- le 8-tris-hydroxyquinoline aluminium (Alq3) qui est une molécule de faible poids moléculaire et dont l'introduction se fait par des techniques de dépôt sous vide. Son spectre d'émission est large et se situe entre 450 et 650 nm,
- le Poly(p-phenylenevinylene) (PPV) qui est un polymère conjugué et dont le dépôt se fait par des techniques en solution (Spin Coating, Dip Coating, ...). Le spectre d'émission de ce polymère est centré sur 550 nm.

La cathode est généralement réalisée à partir de métaux ou d'alliages métalliques (Al, Ag, MgAg, MgAl, ...). L'anode, qui est généralement l'électrode transparente permettant l'extraction de la lumière, est réalisée le plus souvent en ITO (Indium Tin Oxyde).

Pour plus de détails sur les différents matériaux utilisés dans les OLED et leurs propriétés, nous reporterons le lecteur à la revue très complète de Mitschke et al. (Mitschke 2000).

2.3.1.3. Performances

La technologie OLED a réalisé d'énormes avancées depuis une vingtaine d'années, ce qui a permis d'améliorer la luminosité, la stabilité dans le temps, ou encore le rendu des couleurs. Ces avancées en font aujourd'hui des concurrents sérieux des technologies LCD, plasma ou rétro-éclairage dans le domaine de l'affichage ou des technologies des tubes à fluorescence ou des LED inorganiques dans le domaine de l'éclairage. Plusieurs produits à base d'OLED ont ainsi été mis sur le marché, de l'écran dit "nomade" (lecteur MP3, téléphone portable, autoradios, ...) à des écrans plats de grandes tailles de quelques millimètres d'épaisseurs (Sony, Phillips).

Pour notre application, la principale difficulté est de définir les performances du dispositif. Par exemple, la durée de vie, qui est un paramètre important dans les domaines de l'affichage et de l'éclairage, est moins critique dans notre cas puisque les sources d'excitation sont allumées individuellement pendant de faibles durées et que le dispositif lui-même présentera une durée d'utilisation d'une journée à quelques semaines.

Toutefois, nous avons identifié des caractéristiques contraignantes pour l'intégration de ces sources dans un biocapteur tel que celui développé au laboratoire (voir § 1.9.2.1) :

- la directivité de l'émission. Les matériaux organiques ont des indices de réfraction élevés (de l'ordre de 1,6 à 2) qui rendent l'extraction de la lumière de ces matériaux difficile et leur confère une très faible directivité d'émission (voir Figure 2.11 a),
- le spectre d'émission. Les matériaux organiques électroluminescents possèdent généralement des spectres d'émission très larges (de l'ordre de 100 à 200 nm, voir Figure 2.11 b) qui permettent d'obtenir de très bons rendus de couleur, caractéristique importante pour le domaine de l'affichage, mais qui pose problèmes pour l'intégration de ces sources dans un lecteur optique de fluorescence.

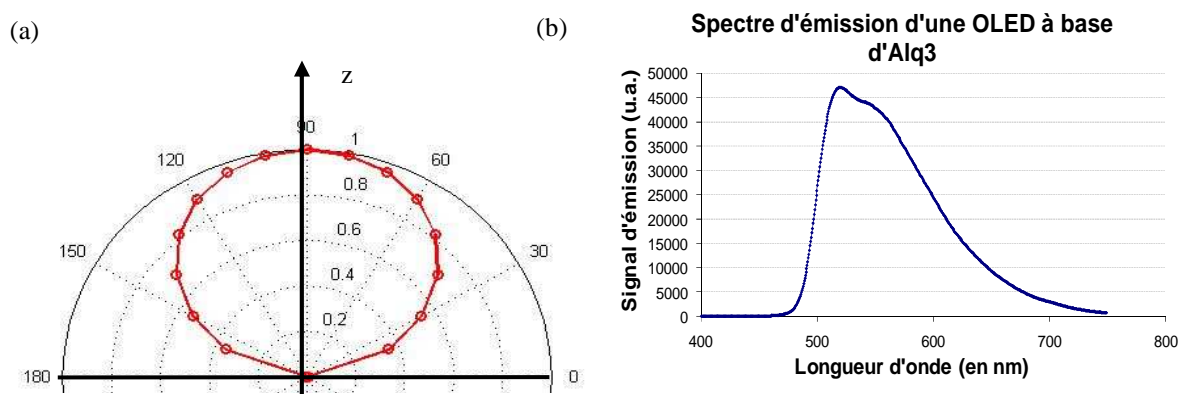


Figure 2.11. Diagramme d'émission en coordonnées polaires (a) et spectre d'émission (b) d'une OLED à base du matériau organique Alq3. Données mesurées à partir des OLED fournies par le DIHS du CEA Grenoble et caractérisées sur un banc goniométrique (voir Annexe A.3))

Ces deux propriétés, comme nous l'avons vu en fin de chapitre 1, doivent être modifiées pour l'intégration de ce type de source dans un biocapteur tel que celui développé au laboratoire.

Nous allons à présent étudier l'influence de la directivité et du large spectre des OLED sur les performances qu'il est possible d'atteindre avec l'instrument développé au laboratoire dans le cas de l'intégration de ces sources dans son composant.

2.3.2. Analyse de l'influence de la directivité et du spectre d'émission des OLED sur les performances de détection

Plusieurs phénomènes pouvant faire baisser la limite de détection de l'instrument due à la faible directivité et au large spectre des OLED ont été identifiés. Ces phénomènes sont :

- l'éclairage simultané de plusieurs plots biologiques par une seule source d'excitation due à la faible directivité de la source. Le signal des plots biologiques entourant le plot interrogé crée un offset sur la mesure nuisant aux performances du système (voir Figure 1.32). Nous avons choisi de nommer ce phénomène la "diaphotie",
- le large spectre de la source dont une partie de son émission est comprise dans le domaine d'émission des fluorophores excités. Ce signal, s'il est couplé dans la lame (par exemple par diffusion) crée un signal d'offset important au niveau du détecteur limitant les performances du système,
- l'éclairage direct du détecteur du à la faible directivité d'émission des OLED. Une partie de leur énergie peut être émise avec des angles supérieurs à l'angle limite de réflexion totale et donc se propager dans la lame jusqu'au détecteur créant un offset important (voir Figure 1.34).

Dans un premier temps, nous allons étudier l'influence de la directivité des OLED sur le phénomène de diaphotie. Puis, nous allons établir les relations permettant de prendre en compte les propriétés spectrales des éléments considérés (filtres, fluorophores, ...) afin de simuler la chaîne photométrique du système. A partir de ces relations, nous étudierons alors l'influence du filtrage de la source et de l'éclairage direct du détecteur sur les performances du système.

2.3.2.1. Influence de la directivité des OLED sur le phénomène de diaphotie

Le dispositif que nous avons développé utilise un balayage discret des différents plots biologiques afin de pouvoir détecter plusieurs agents pathogènes sur une même lame. Cependant, ce système ne fonctionne que si un seul plot est excité à la fois. Nous allons donc tenter ici d'étudier l'effet de la directivité des sources d'excitation sur ce phénomène et sur les performances que l'on peut atteindre.

Quantifier cette incidence est une chose difficile car les performances attendues d'un système de détection sont très liées au contexte d'usage qui pourra être très différent d'une situation à l'autre. C'est pourquoi, bien que l'analyse livrée ci-après puisse paraître quantitative, les résultats des calculs doivent être considérés comme des tendances. Nous retiendrons cependant que les outils utilisés pour conduire cette analyse peuvent donner des résultats quantitatifs pour une situation bien définie.

Notion de dynamique utile

La dynamique utile est une notion utilisée dans notre laboratoire (Perraut 2002) afin d'exprimer le rapport des signaux exploités par les utilisateurs, en l'occurrence, les biologistes. Cette dynamique utile peut être différente de la dynamique du détecteur car elle inclut intrinsèquement certaines limitations liées aux réactions biologiques (adsorption non spécifique, offsets ajoutés par la chimie de couplage, auto-fluorescence des matériaux ...).

Elle est définie comme le rapport entre les signaux maximum et minimum exploités pour réaliser l'interprétation des mesures.

Pour une puce à ADN, la densité des sondes de capture est proche de 10^4 molécules/ μm^2 (Pirring 1996). De nombreux travaux ont montré que le nombre de sondes de captures occupées est de l'ordre de 10 % du nombre de sondes à saturation (Niu 2008), soit à savoir, après réaction, au maximum 1 000 molécules fluorescentes par micromètres carrés (10^3 molécules/ μm^2).

La limite de détection de l'instrument conçu au laboratoire est de 1 à 10 molécules/ μm^2 (Schultz 2007). Nous prendrons la valeur de 1 molécule/ μm^2 : la dynamique utile sera donc égale, pour les puces à ADN, à 1 000.

La densité de sites immobilisés pour les puces à anticorps est en général dix fois plus faible que celle des puces à ADN. Nous ne connaissons pas le rendement d'occupation des sites à saturation et nous le supposons égal à 1.

Nous choisirons donc comme paramètre de dynamique utile la valeur de 1 000.

Cette dynamique n'est pas une valeur extrême car certains scanners de biopuces présentent des dynamiques supérieures, en particulier celui mis au point il y a quelques années au laboratoire (Perraut 2002) qui permettait une dynamique utile expérimentale de 30 000. Compte tenu des nombreuses hypothèses précédentes, nous considérons que 1 000 est une bonne valeur pour un dimensionnement.

Influence de la directivité

En cas de non directivité des sources d'excitation, l'éclairage d'un plot entraînera l'éclairage des plots voisins. La configuration la moins favorable que nous retiendrons est celle décrite par la figure suivante :

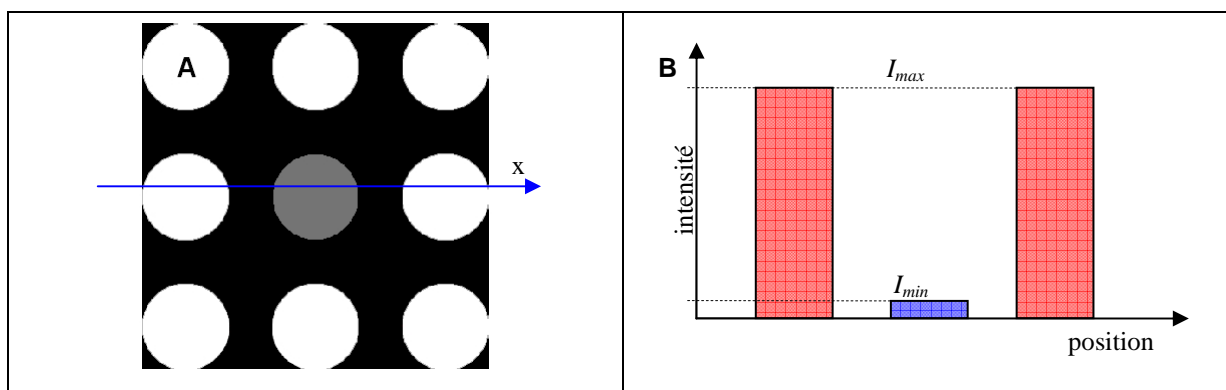


Figure 2.12. Figure 1 – Configuration d'étude pour une biopuce. A) exemple d'image synthétique permettant de simuler l'effet du voisinage : le plot central est ici plus faiblement lumineux que les voisins. B) correspondance en intensité de fluorescence : I_{min} correspond à l'intensité du plot central quand I_{max} correspond à celle des plots voisins.

Le plot analysé est le plot central dont le signal est arbitrairement égal à 1 ($I_{min} = 1$) et nous allons étudier l'influence du voisinage selon la directivité de la source et la dynamique entre le plot central et les voisins, idéalement de 1 000 ($I_{max} = 1\,000$).

Dans un premier temps, nous comparerons le signal mesuré avec et sans voisinage : pour éviter une fausse alerte, l'augmentation du signal mesuré avec un voisinage (offset) doit être inférieure au signal généré par le plot central seul. Nous fixerons comme critère que l'excitation n'est pas assez directive si l'offset est égal ou supérieur à I_{min} .

Dans un deuxième temps, nous considérerons qu'une procédure pouvant s'apparenter à une déconvolution est appliquée pour retirer les signaux parasites émis par le voisinage : c'est alors l'incertitude de mesure liée au bruit de photons de l'offset engendré par le voisinage qui limite les performances de détection (sans présager ni des

incertitudes provenant de la procédure de correction ni de la procédure de correction elle même).

Lors des calculs, nous avons utilisé deux types d'indicatrice d'émission : la première est isotrope (le même flux de photons est émis dans toutes les directions de l'espace), la deuxième est définie par :

$$I(\theta) = I_0 \times \cos(\theta)^5 \quad \text{Eq. 2.5.}$$

Cette dernière loi a été choisie pour simuler l'émission d'une source directive dont l'angle d'émission à mi-hauteur est de 30° . Nous vérifierons sa pertinence lors de la présentation des mesures expérimentales sur des sources organiques que nous avons rendu directives et moins large spectralement grâce à l'utilisation d'une microcavité de type Fabry Péro.

Dans les calculs, les diamètres des sources et des plots sont égaux à 1 mm et le pas varie de 1 mm (plots adjacents) à 4 mm.

Pour une source isotrope et une dynamique utile de 1, le signal du voisinage devient inférieur à 1 pour un pas de 1,5 mm contre 1,2 mm pour une source plus directive.

Pour une dynamique utile de 1 000, il faut que les plots soient espacés de 2,7 mm pour une source isotrope et de 2,5 mm pour une source plus directive (voir Figure 2.13).

Une façon de réduire cette diaphotie consiste à placer les sources sur un support moins épais. Avec une lame de $700 \mu\text{m}$, des pas de 2,1 et 2 mm sont envisageables pour des sources isotropes et directives. Utiliser une lame de $500 \mu\text{m}$ risque d'entraîner des contraintes sur les procédures de fabrication, sur le conditionnement et sur la manipulation de la puce. Le pas minimum n'est alors que de 1,75 et 1,65 mm pour les deux configurations : le gain relatif devint marginal.

La figure suivante illustre la variation du rapport entre l'offset et le signal minimum selon le pas.

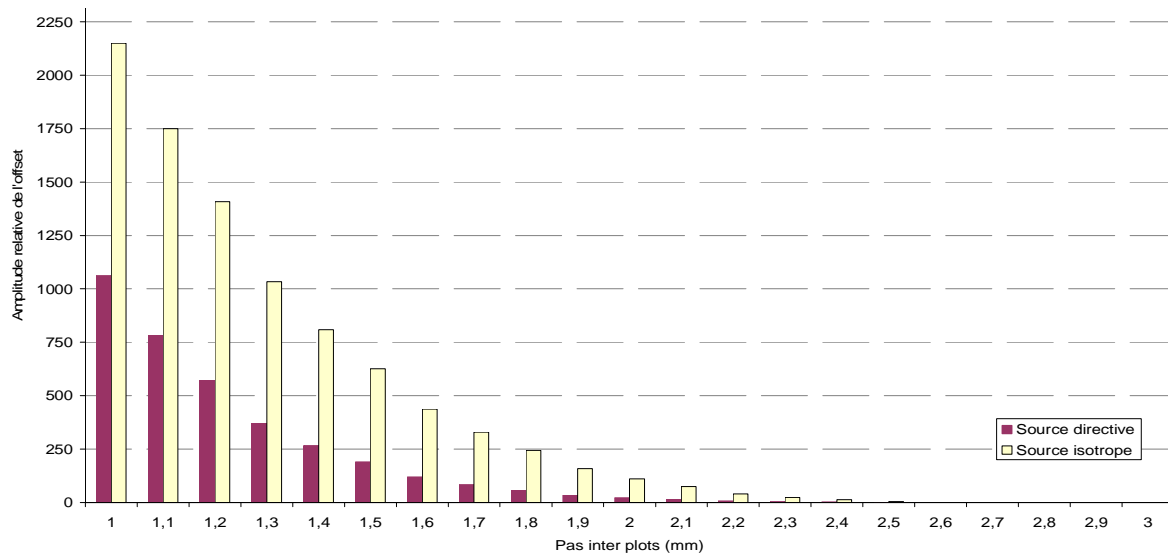


Figure 2.13. Variation du rapport entre l'offset engendré par un voisinage et le signal émis par un plot central quand la dynamique est de 1 000 pour deux directrices d'émission différentes.

S'il est possible de corriger, via une procédure à définir, les niveaux de signaux, la limitation sera alors celle de l'incertitude sur la mesure de l'offset.

Si on considère que l'origine de cette incertitude est uniquement le bruit de photons, alors, le signal minimum détectable I_{min} sera égal à :

$$I_{min} = 3 \times \sqrt{2 \times Offset} \quad \text{Eq. 2.6.}$$

où *Offset* correspond à la mesure de l'offset.

Pour un support de 1 mm, on pourra détecter le signal minimum dès un pas de 1 mm pour les deux types d'indicateurs d'émission.

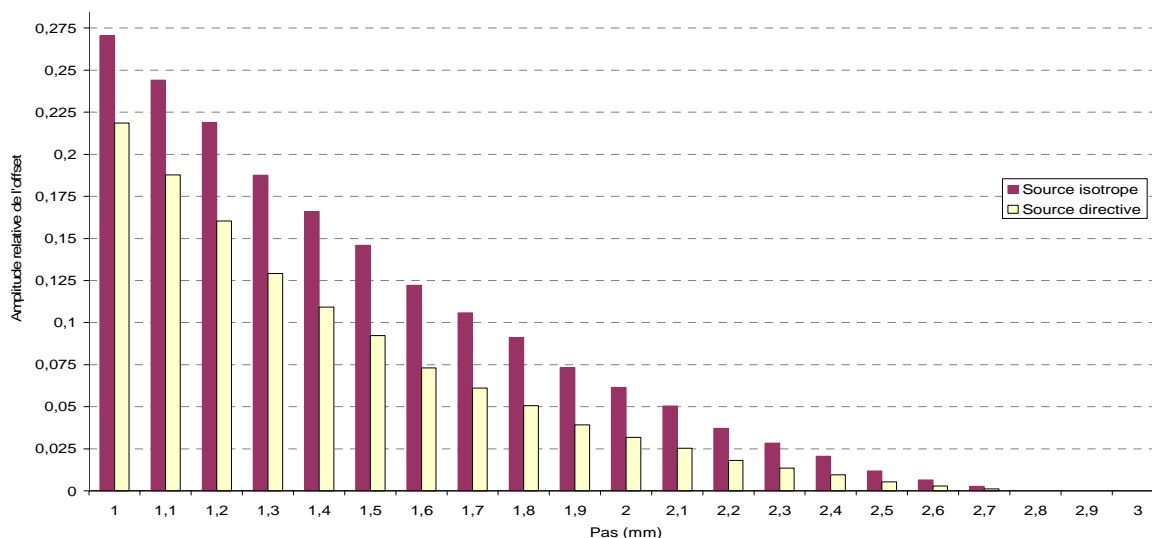


Figure 2.14. – Variation du rapport entre l'offset engendré par un voisinage et le signal émis par un plot central quand la dynamique est de 1 000 pour deux directrices d'émissions différentes si on considère qu'une procédure parfaite de correction est appliquée.

Sous réserve de pouvoir appliquer une procédure de correction, la directivité des sources n'a pas d'incidence sur la diaphotie et ce n'est pas une contrainte très forte.

Les critères les plus importants sont alors le couplage du signal d'excitation par réflexion totale dans la lame de verre pouvant créer un fort signal d'offset au niveau du détecteur et le filtrage du signal d'excitation dans le domaine de transmission du filtre en émission. En effet, certaines directions d'émission de l'OLED pourront se retrouver piégées dans la lame quand elles sont émises à un angle d'émission supérieur à l'angle limite de réflexion totale. Ainsi si le filtrage de la source n'est pas optimal dans le domaine d'émission des fluorophores, cela créera un important signal d'offset. Afin d'étudier ces phénomènes, nous allons, dans le paragraphe suivant, définir des relations permettant de modéliser la chaîne photométrique de notre système. Ces relations nous serviront ensuite à quantifier l'importance de ces phénomènes sur les performances de l'instrument.

2.3.2.2. Etude de la chaîne photométrique du système

Flux émis par une molécule fluorescente

Afin de réaliser l'analyse de la chaîne photométrique du système et prendre en compte les propriétés spectrales des différents éléments la constituant nous avons effectué quelques approximations. Nous considérerons ainsi que :

- le rendement quantique du détecteur est constant dans le domaine spectral d'émission des fluorophores,
- l'émission de fluorescence est distribuée spectralement de la même façon quelle que soit la longueur d'onde du photon absorbé ce qui nous permet de dissocier l'absorption de l'émission.

La chaîne photométrique de la détection de photon de fluorescence peut être décomposée de la manière suivante (voir Figure 2.15) :

- une source d'excitation dont le spectre d'émission est $S_s(\lambda)$ et la densité de puissance émise mesurée après le filtre d'excitation est D_{pex} ,
- un filtre en excitation dont le spectre de transmission est $T_{Fex}(\lambda)$,
- un fluorophore dont le spectre d'absorption est $A_F(\lambda)$, la section efficace maximale σ_a , le spectre d'émission $E_F(\lambda)$, et le rendement quantique d'émission $QE_F(\lambda)$,
- un collecteur de signal de fluorescence (qui est dans notre système la lame de verre) de rendement de collection η_c ,
- un filtre en émission dont le spectre de transmission est $T_{Fem}(\lambda)$,
- et un détecteur de rendement quantique QE_D .

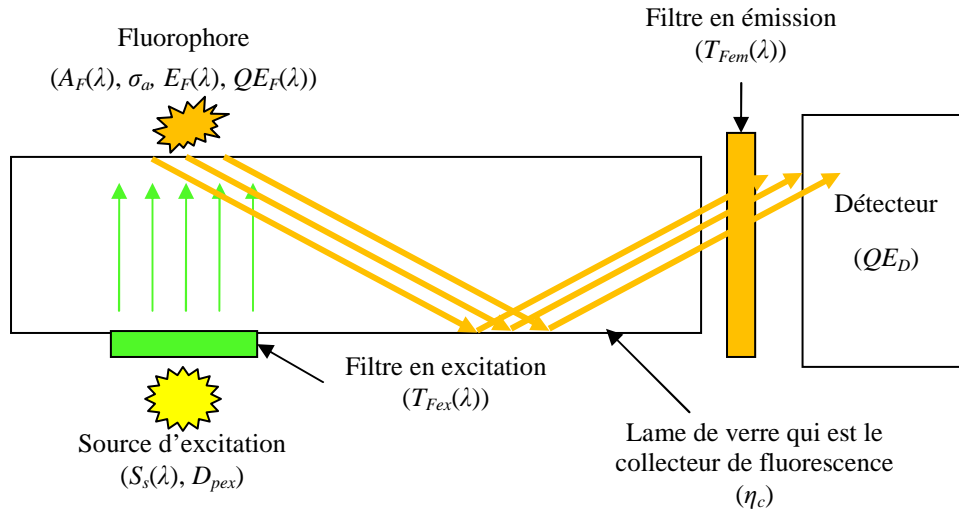


Figure 2.15. Schéma représentant la décomposition de la chaîne photométrique d'excitation et de détection de la fluorescence d'une molécule dans le système développé au laboratoire.

Le nombre de photo-électrons¹ (N_{phe}) issue de la détection de la fluorescence en bout de lame est alors donné par :

$$N_{phe} = N_{abs} \cdot \gamma_F \cdot \eta_c \cdot QE_D \quad \text{Eq. 2.7.}$$

où N_{abs} représente le nombre de photon absorbé, et γ_F le rendement de conversion du système {fluorophore, filtre d'émission} :

¹ Un photo-électron (ou photo-événement) est défini comme l'électron produit par la conversion d'un photon par la surface sensible du détecteur

$$N_{abs} = \frac{t \cdot \sigma_a \cdot D_{pex}}{hc} \cdot \frac{\int_0^\infty \underline{S_s}(\lambda) \cdot \underline{T_{Fex}}(\lambda) \cdot \underline{A_F}(\lambda) \cdot \lambda \cdot d\lambda}{\int_0^\infty \underline{S_s}(\lambda) \cdot \underline{T_{Fex}}(\lambda) \cdot d\lambda} \quad \text{Eq. 2.8.}$$

$$\gamma_F = QE_F \cdot \frac{\int_0^\infty \underline{E_F}(\lambda) \cdot T_{Fem}(\lambda) \cdot d\lambda}{\int_0^\infty \underline{E_F}(\lambda) \cdot d\lambda} \quad \text{Eq. 2.9.}$$

où t représente le temps de mesure, h la constante de Planck et c la célérité de la lumière. Le signe "_" représente la normalisation à 1 de la fonction.

Rendement de collection de fluorescence du système

Le rendement de collection de fluorescence du système correspond au produit de la fraction de l'émission du fluorophore qui est couplée dans la lame par l'angle solide à l'intérieur duquel la fluorescence est guidée dans la lame vers le détecteur.

Ruckstuhl et al. (Ruckstuhl 2000) montrent qu'environ 30 % de la fluorescence d'un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope et situés dans de l'eau à l'interface d'une lame de verre est couplée, par un phénomène en champ proche, dans cette dernière. Cette valeur sera confirmée par les modèles que nous développerons afin de modéliser les propriétés d'émission d'un dipôle dans une cavité asymétrique (voir § 2.5).

D'autre part, on estime que seul le flux de fluorescence transporté par le cône défini par l'angle limite de réflexion totale sur les bords de la lame parvient au détecteur. On définit alors deux angles limites de réflexion totale (voir Figure 2.16) :

- θ_c : angle limite de réflexion totale selon l'axe vertical défini par les indices de réfraction n_5 (indice de la lame) et n_3 (indice de l'échantillon),
- θ'_c : angle limite de réflexion totale dans le plan défini par les indices n_5 (indice de la lame) et n_{ext} (indice du milieu extérieur soit de l'air).

par l'angle $\pi - 2\theta'_c$, où θ'_c représente l'angle limite de réflexion totale sur les bords de la lame (voir Figure 2.16), parvient au détecteur.

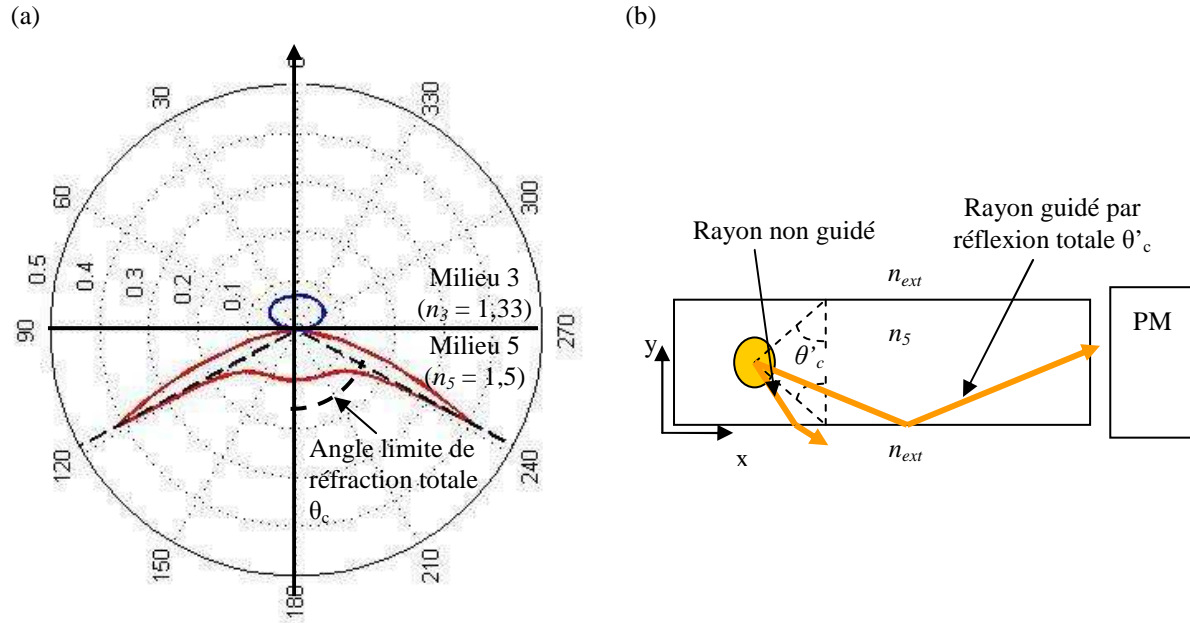


Figure 2.16. (a) : diagramme d'émission d'un ensemble de dipôles orientés aléatoirement à l'interface d'une lame de verre. Ce graphique a été calculé à partir du modèle développé au paragraphe 2.5.2. (b) : Représentation en vue de dessus du guidage de la fluorescence par réflexion totale à l'intérieur de la lame de verre.

On définit alors le rendement de collection de fluorescence du système par :

$$\eta_c = 0,3 \times \left(\frac{1}{2} - \frac{1}{\pi} \operatorname{asin} \left(\frac{n_{ext}}{n_5} \right) \right) \quad \text{Eq. 2.10.}$$

où n_{ext} est l'indice de réfraction du milieu extérieur (air) et n_5 l'indice de réfraction de la lame (verre).

2.3.2.3. Effet du filtrage

Afin d'étudier l'effet du filtrage de la source d'excitation et de l'émission des fluorophores sur les performances de l'instrument, nous utilisons les données suivantes dans nos calculs :

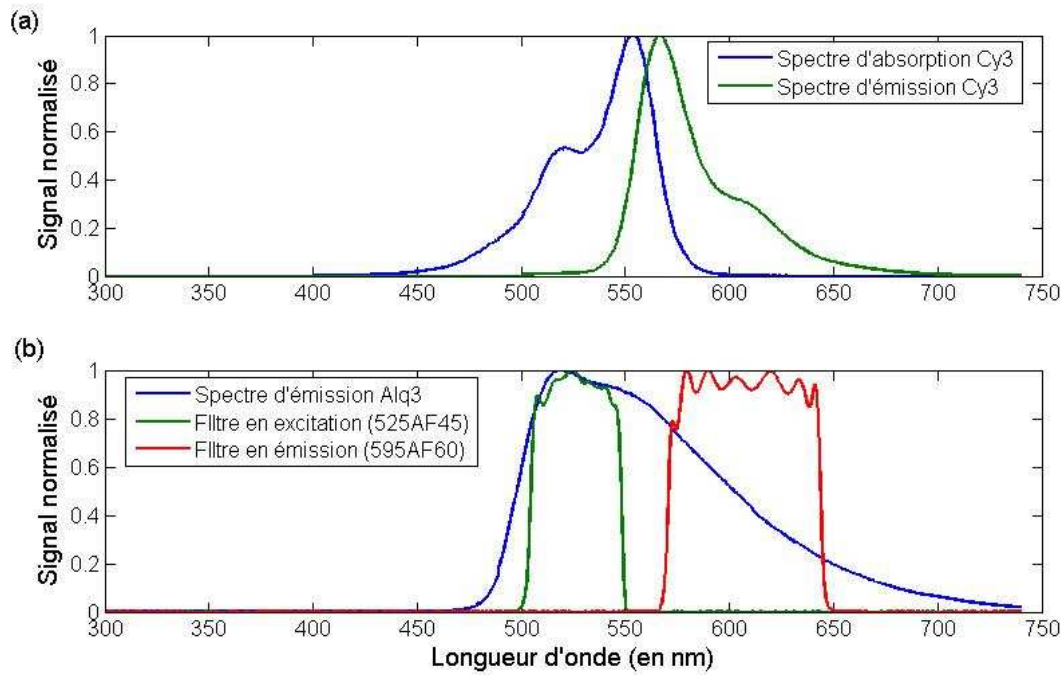


Figure 2.17. (a) : Spectre d'absorption et d'émission du fluorophore Cy3 actuellement utilisé dans l'instrument développé au laboratoire (d'après www.omegafilters.com/curvo2/). (b) : Spectre d'émission d'une OLED à base du matériau Alq₃ (données tirées de la caractérisation d'OLED réalisées par le CEA/DIHS) et spectres des filtres en excitation et en émission actuellement utilisés sur l'instrument développé au laboratoire.

Nous calculons alors que le signal de fluorescence d'un plot de 1 mm² ayant une densité de fluorophores de 1 molécule/μm² (limite de détection de l'instrument développé au laboratoire) est de :

	Signal de fluorescence (en Photoévénements)	
	Avec	Sans
Pour 1 molécule	6,38.10 ⁻²	9,93.10 ⁻²
Pour la surface (1 mm ²)	63838	99320

Table 2.1 Nombre théorique de photo-événements issus du signal de fluorescence pour une mesure avec ou sans filtres. La densité de fluorophores est de 1 molécule/μm².

où nous avons utilisé les valeurs suivantes des différents paramètres de calcul :

- $t = 1$ s : temps de mesure,
- $\sigma_a = 6.10^{-20}$ m² : section efficace d'absorption maximale du fluorophore Cy3 (Mujumdar 1993),
- $D_{pex} = 1300$ W/m² : densité de puissance mesurée sur l'instrument développé au laboratoire,
- $QE_F = 0,04$: rendement quantique maximal du fluorophore Cy3 dans un tampon PBS (Mujumdar 1993),
- $QE_D = 0,4$: rendement quantique du détecteur (donnée constructeur Hamamatsu),
- $n_{ext} = 1$: indice de réfraction du milieu extérieur,
- $n_s = 1,5$: indice de réfraction de la lame de verre,

On observe alors que ne pas utiliser de filtre ne permet d'accroître le signal de fluorescence mesuré d'un facteur 1,5 seulement, soit un gain très marginal en sensibilité (20 %). L'utilisation de filtres n'a donc que peu d'impact sur la quantité de signal de fluorescence détecté mais peut jouer un rôle prépondérant sur les performances du

système en filtrant les signaux non spécifiques issus par exemple du couplage direct du signal d'excitation dans la lame. C'est ce dernier point que nous allons à présent étudier.

2.3.2.4. Effet de l'éclairage direct du détecteur

Dans le cas de sources d'excitation peu directives, comme les OLED, certaines directions d'émission peuvent se retrouver piégées dans la lame si elles sont émises à un angle d'émission supérieur à l'angle limite de réflexion totale (voir Figure 2.18). Cette émission, si elle n'est pas filtrée, peut alors créer un important signal d'offset et donc limiter les performances de l'instrument.

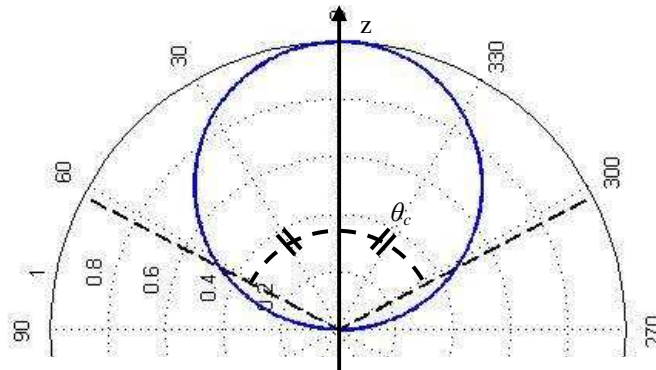


Figure 2.18. Diagramme d'émission, en coordonnées polaires, d'une source lambertienne (cas de la plupart des OLED : voir Figure 3.55). L'angle limite de réflexion totale θ_c entre la lame de verre (d'indice de réfraction 1,5) et le milieu extérieur (d'indice de réfraction 1,33) est aussi représenté. Une partie de l'émission de la source se retrouve donc piégée dans la lame.

Cas d'une source isotrope en flux

Considérons, tout d'abord, une source isotrope en flux, c'est-à-dire dont l'émission est constante quelque soit la direction d'émission et cherchons à déterminer le nombre de photons détecté du fait de l'éclairage direct du détecteur. En première approximation nous ne prenons pas en compte de l'excitation possible des plots voisins par le champ évanescent du signal d'excitation du fait de son couplé partiel dans la lame par réflexion totale.

Le rendement de collection de la lame pour l'éclairage en direct par une telle source peut alors être défini, en première approximation, par le rapport entre une surface S_d défini par les angles limites de réflexion totale θ'_c et θ_c (voir Figure 2.19) et la surface d'une demi sphère de rayon e , épaisseur de la lame :

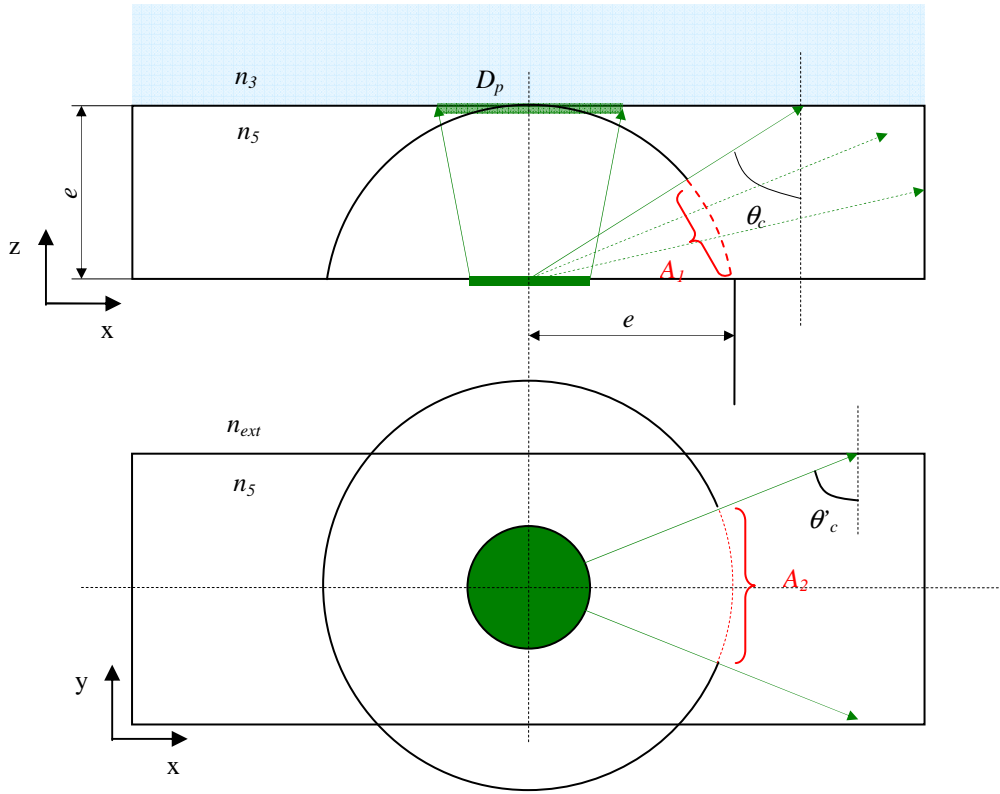


Figure 2.19. Définition graphique de la surface S_d : on assimile S_d au produit des arcs de cercles A_1 et A_2 .

$$S_d = e^2 \cdot (\pi - 2\theta'_c - \theta_c) \quad \text{Eq. 2.11.}$$

où θ'_c et θ_c représentent les angles limites de réflexion totale sur les bords de la lame et le haut de la lame respectivement, et e l'épaisseur de la lame.

Le flux F_{Sd} émis par la source vers le détecteur est alors égal (pour une source isotrope) au flux traversant la surface S_d :

$$F_{Sd} = S_d \times \int_0^\infty D_p(\lambda) d\lambda \quad \text{Eq. 2.12.}$$

où $D_p(\lambda)$ représente la densité de puissance émise par la source (en W/m²).

En prenant en compte la transmission des filtres d'excitation et d'émission, on en déduit que le nombre de photo-événements détectés sur le PM provenant de l'éclairage direct de ce dernier par la source est donné par :

$$N_{Phe}^D = \frac{QE_D}{hc} \cdot S_d \cdot \alpha_s \cdot \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} S_s(\lambda) \cdot T_{Fem}(\lambda) \cdot T_{Fex}(\lambda) \cdot \lambda \cdot d\lambda \quad \text{Eq. 2.13.}$$

où α_s est le facteur permettant de déterminer la densité de puissance D_p de la source pour chaque intervalle de longueur d'onde (voir Annexe B) et λ_1 et λ_2 sont les longueurs d'onde de l'intervalle spectral considéré (typiquement l'intervalle de transmission du filtre en émission).

Prise en compte de la directivité de la source

Si on considère à présent une source directive dont le diagramme d'émission est $I(\theta)$, la quantité de photons couplés dans la lame sera alors réduite d'un facteur γ :

$$\gamma = \frac{\int_{\theta_c}^{\pi/2} I(\theta) d\theta}{\int_{\theta_c}^{\pi/2} d\theta} \quad \text{Eq. 2.14.}$$

c'est-à-dire du rapport entre le flux émis par la source $I(\theta)$ couplée dans la lame et le flux émis par une source isotrope en flux couplé dans la lame par réflexion totale.

Influence du filtrage sur le flux en direct

Pour les calculs réalisés dans ce paragraphe, nous reprenons les valeurs des paramètres données au paragraphe 2.3.2.3. D'autre part, nous utilisons des fonctions portes comme profils des filtres avec un taux de transmission de 100 % dans la bande de transmission déterminée à partir des spectres expérimentaux (représentés sur la Figure 2.17 (b)) et avec un taux de réjection de 1 à 10^{-10} . Le choix d'une transmission de 1 est justifié car nous avons vu qu'on gagne peu sur le flux émis en travaillant sans filtre.

Par ailleurs, nous prenons comme critère que le rapport signal à bruit au niveau du détecteur doit être supérieur à 1,5 afin de pouvoir détecter la fluorescence des plots biologiques. Le rapport signal sur bruit est défini par :

$$SNR = \frac{N_{Phe}}{3\sqrt{N_{Phe}^D}} \quad \text{Eq. 2.15.}$$

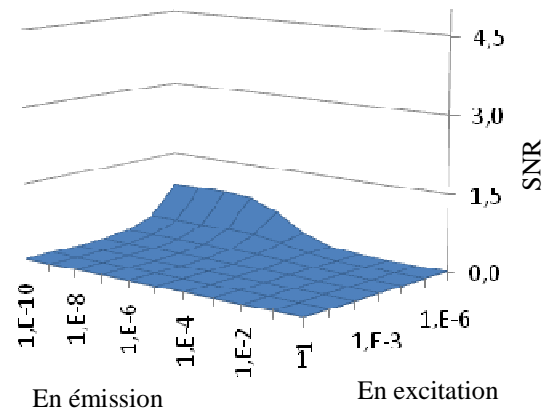
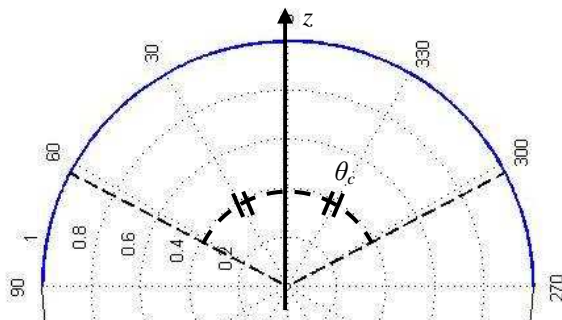
où N_{Phe} est le nombre de photo-événements issue de la détection du signal de fluorescence des plots biologiques (voir eq 2.7) et N_{Phe}^D le nombre de photo-événements issue de l'éclairage en direct du détecteur par la source d'excitation (voir eq 2.13).

Enfin, nous considérons différents diagrammes d'émission possibles de sources plus ou moins directives que l'on modélise par les fonctions : $I(\theta) = \cos^d(\theta)$ avec $d = 0, 1, \dots, 5$.

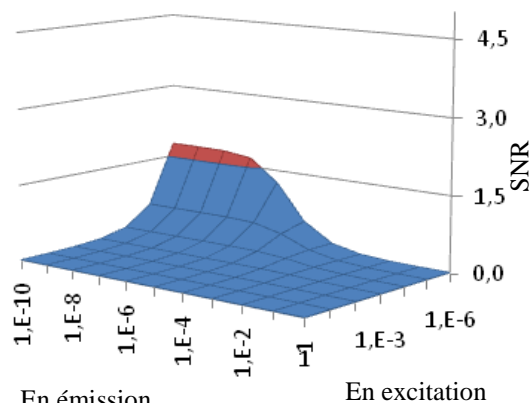
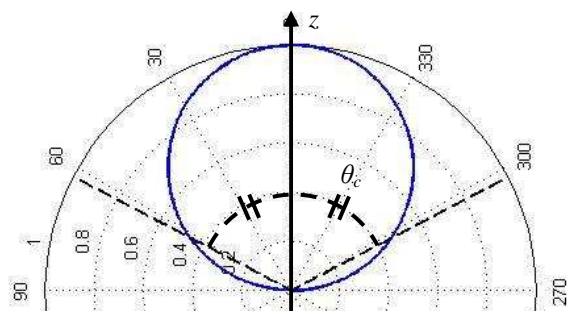
Nous obtenons alors, en fonction du taux de réjection du filtrage en excitation et en émission, que :

- a. pour une source isotrope en flux :

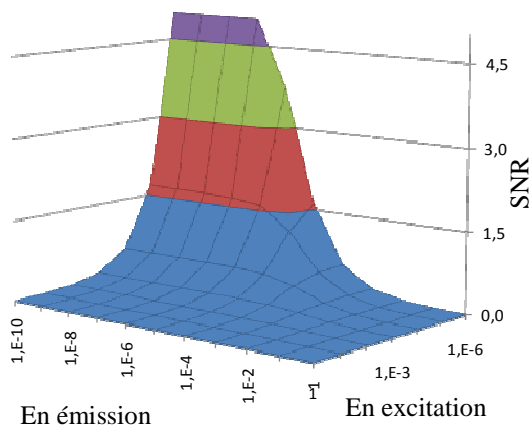
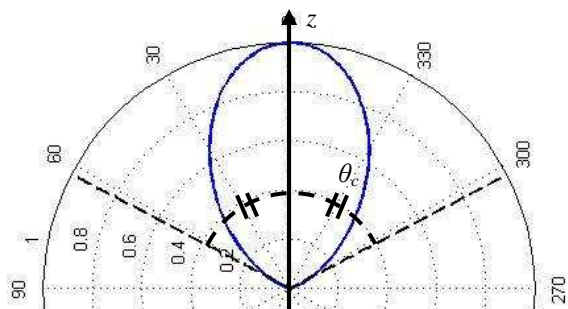
$$I(\theta) = \cos^0(\theta)$$



b. pour une source lambertienne : $I(\theta) = \cos(\theta)$



c. pour une source : $I(\theta) = \cos^3(\theta)$



d. pour une source : $I(\theta) = \cos^5(\theta)$

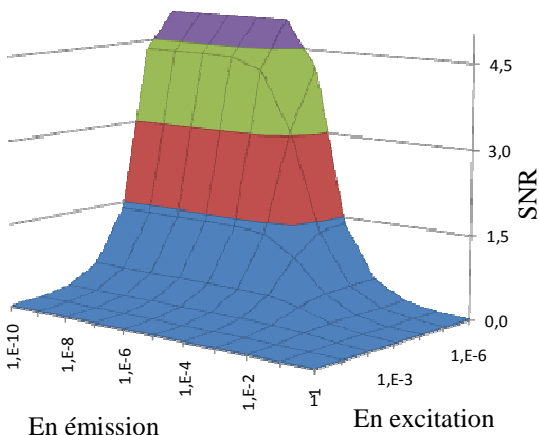
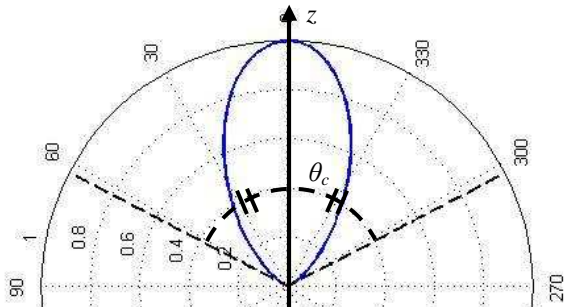


Figure 2.20. Diagramme d'émission en coordonnées polaires et rapport signal sur bruit (SNR) pour différentes directivités de sources et en fonction du taux de réjection des filtres en excitation et en émission. Cela permet de déterminer le filtrage nécessaire afin d'atteindre une limite de détection de 1 molécule/ μm^2 pour une directivité de source d'excitation donnée. Les rapports signal sur bruit ont été tronqués à 4,5 pour plus de lisibilité des figures.

On observe donc que suivant la directivité de la source d'excitation le filtrage nécessaire afin d'atteindre une limite de détection de 1 molécule/ μm^2 peut varier fortement. Ainsi, plus la source est directive et moins les contraintes sur le filtrage sont importantes afin d'atteindre un rapport signal sur bruit supérieur à 1,5.

On remarque ainsi que :

- Pour une source isotrope en flux (voir Figure 2.20 (a)) les contraintes en filtrage sont très importantes car une trop grande quantité de signal d'excitation est couplée par réflexion totale dans la lame de verre,
- pour une source lambertienne (voir Figure 2.20 (b)), il est nécessaire d'avoir au minimum des taux de

réjection en excitation de 10^{-6} et en émission de 10^{-7} ,

- pour une source directive de diagramme d'émission en $\cos^5\theta$ (voir Figure 2.20 (d)) des taux de réjection en excitation de 10^{-4} et en émission de 10^{-5} peuvent suffir.

Pour comparaison, le filtrage utilisé aujourd'hui sur l'instrument est constitué par un filtre interférentiel en excitation (525AF45) dont le taux de réjection est de 10^{-4} et par deux filtres en émission (un filtre interférentiel (595AF60) et un filtre coloré passe haut (OG570)) dont le taux de réjection global est de 10^{-6} .

Une solution pour l'intégration des sources OLED dans le composant de l'instrument développé au laboratoire est donc, d'une part, d'utiliser la même combinaison de filtres en émission et, d'autre part, d'optimiser la directivité et le filtrage de ces sources afin d'obtenir un diagramme d'émission de demi-largeur à mi-hauteur de 30° et un taux de réjection de l'ordre de 10^{-4} dans le domaine d'émission des fluorophores.

2.3.2.5. Influence de la directivité et du spectre des OLED – Conclusions

Cette analyse de l'influence de la directivité et du spectre des OLED sur les performances de l'instrument nous a permis de montrer que :

- le phénomène de diaphotie dû à une faible directivité des OLED ne limite pas les performances du système sous réserve de pouvoir appliquer une procédure de correction des mesures. Dans ce cas, la directivité de la source a peu d'influence,
- l'éclairage direct du détecteur par une partie de l'émission de l'OLED couplée dans la lame de verre est le phénomène le plus limitant. En effet, ce phénomène impose des contraintes fortes sur la directivité et le filtrage de la source afin de pouvoir atteindre de bonnes performances de détection.

Ce dernier point impose donc de pourvoir améliorer la directivité et de réduire l'intervalle spectral d'émission des OLED pour leur intégration dans le composant.

Pour cela, nous allons à présent regarder les solutions présentées dans la littérature permettant de modifier et contrôler ces propriétés d'émission des OLED. Nous décrivons ensuite la méthode que nous avons retenue dans mon travail de thèse.

2.3.3. Solutions présentées dans la littérature

Les différentes solutions présentées dans la littérature pour réduire l'intervalle spectral d'émission et/ou améliorer la directivité des OLED peuvent être séparées en deux catégories :

- les solutions passives qui empêchent simplement les longueurs d'onde et/ou directions d'émission non désirées d'atteindre la zone sensible,
- les solutions actives permettant de forcer les centres émetteurs des OLED à émettre dans certaines directions et dans certains intervalles spectraux, c'est-à-dire dans certains modes d'émission que l'on peut contrôler.

Ces dernières solutions présentent l'avantage de minimiser les pertes de signal. En effet, au lieu de chercher à éliminer une part de l'émission des sources et donc d'avoir une perte de puissance, ces solutions, de part des modifications de l'environnement des dipôles, forcent ces derniers à émettre toute leur énergie dans certains modes d'émission seulement. L'énergie de la source est alors concentrée uniquement dans ces modes optimisant

ainsi la puissance d'excitation disponible.

Les solutions passives présentées dans la littérature sont principalement des solutions permettant le filtrage de l'OLED en intégrant un filtre passe haut ou passe bande au-dessus de cette dernière. De plus, les solutions passives ne permettent pas de réellement améliorer la directivité de la source et se focalise principalement sur l'extraction de la lumière :

- Rebohle et al. (Rebhole 2005) montrent l'utilisation d'un miroir de Bragg positionné au dessus des sources intégrées sur une plaque de Silicium afin de filtrer leur émission. Des taux de réjection de l'ordre de 10^{-2} sont obtenus et permettent de détecter des fluorophores. Cependant, ce filtrage n'est pas parfait et le signal d'offset est important, ce qui limite la sensibilité du système,
- Hoffman et al. (Hofmann 2006) montrent l'utilisation d'un filtre passe haut entièrement intégré au dispositif. Ce filtre est réalisé en dopant directement la couche micro-fluidique fabriquée en polymère à l'aide d'un colorant absorbant le signal d'excitation. Les performances de filtrage obtenues sont équivalentes à celles des filtres colorés. Cette solution a l'avantage d'être entièrement intégrée au dispositif et nécessite moins d'étapes technologiques que pour la réalisation d'un miroir de Bragg. Cependant, le problème de l'autofluorescence du filtre coloré est important et génère un signal de fond nuisant à la sensibilité du système. Les contraintes de notre application ne permettent pas d'utiliser ce type de solution,
- en jouant sur les épaisseurs et les indices de réfraction des différentes couches composant l'OLED et le substrat, Tsutsui et al. (Tsutsui 2001) montre qu'il est possible d'améliorer l'extraction de lumière. En revanche, la directivité n'est que peu faiblement améliorée et le spectre d'émission est inchangé.

Les solutions passives ne permettent donc pas d'améliorer simultanément le spectre d'émission et la directivité des OLED. De plus, ces techniques impliquent des pertes d'énergie. Nous nous intéresserons donc maintenant aux solutions dites "actives".

Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.2.2, il est nécessaire de modifier l'environnement et donc la densité de modes photoniques à proximité des centres émetteurs de la source afin de forcer cette dernière à émettre uniquement dans certains modes d'émission. Les solutions actives utilisent pour cela des cavités de type Fabry Péroต์ entourant la source.

Plusieurs types de cavité ont été étudiés par le passé :

- des cavités réalisées à l'aide de cristaux photoniques (Lee 2003, Jakubiak 2005). Elles permettent de réduire fortement l'intervalle spectral d'émission des OLED et d'en améliorer fortement l'extraction de lumière. Cependant, la réalisation de cristaux photoniques est difficile et demande de nombreuses étapes technologiques,
- des cavités Fabry Péroต์ qui utilisent des miroirs plans (Nakayama 1993, Takada 1993, Dodabalapur 1994 a, Fisher 1995, Lemmer 1995, Berggren 1996, Dirr 1997). Ces cavités présentent les avantages de permettre un contrôle fin du spectre d'émission ainsi que de la directivité tout en améliorant l'extraction de lumière. Par ailleurs, ces cavités sont plus simples à réaliser techniquement que des cristaux photoniques.

Les cavités planaires de types Fabry Péroต์ présentent en plus l'avantage de pouvoir être modélisées à l'aide

d'une structure de type cavité asymétrique que nous avons présentée au paragraphe 2.1.3. C'est une des raisons qui nous a poussés à tester ce type de cavités.

2.3.4. Justification de la solution choisie

Les raisons qui nous ont amenées à étudier les cavités Fabry Péroต์ planaires afin de modifier et contrôler les propriétés spectrale et spatiale des OLED sont :

- qu'il est possible de réduire à la fois l'intervalle spectral d'émission et d'améliorer la directivité d'une OLED (Nakayama 1993, Takada 1993, Tsutsui 1994, Dodabalapur 1994 a et b, Fisher 1995, Dodabalapur 1996, Berggren 1996, Rigneault 1997) (voir Figure 2.21),

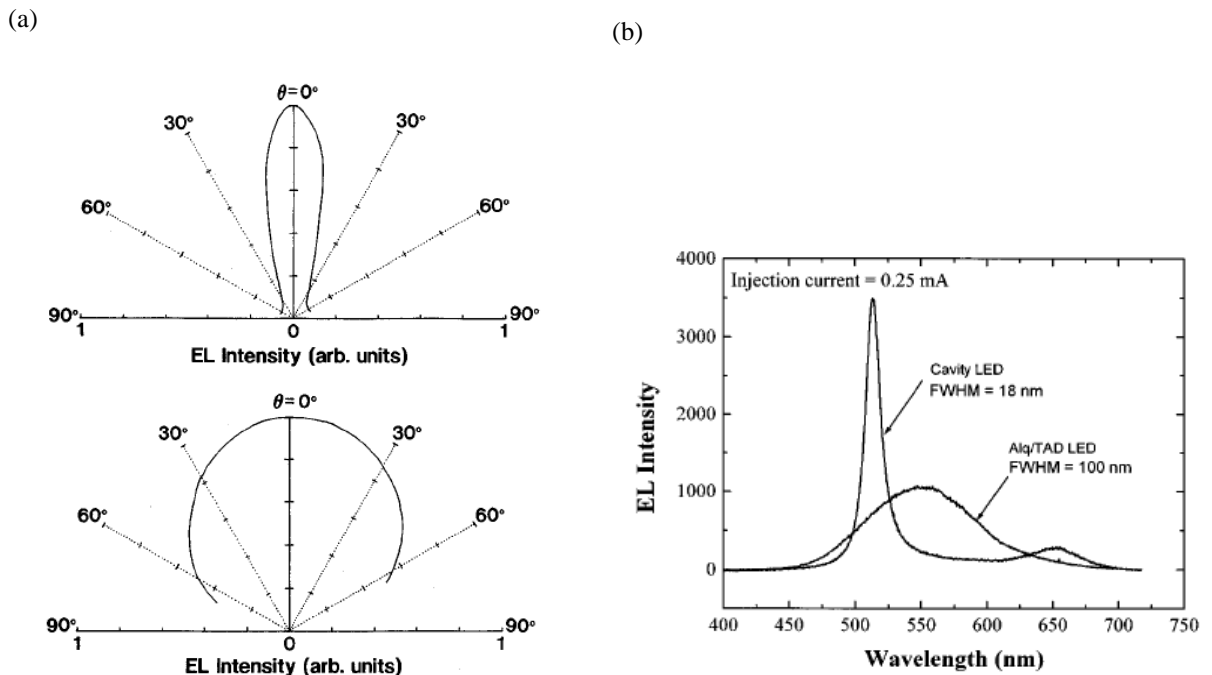


Figure 2.21. Illustration des effets d'une cavité de type Fabry Péroต์ sur le diagramme d'émission et le spectre d'émission d'une OLED. (a) : diagramme d'émission d'une OLED située au non dans une cavité (d'après Tsutsui 1994). (b) : spectre d'émission d'une OLED avec ou sans cavité (d'après Dodabalapur 1996)

- que ce type de cavité permet d'améliorer l'extraction de lumière de l'OLED et donc d'augmenter la puissance émise (Dirr 1997, voir Figure 2.7),
- que la réalisation de telles cavités peut être très simple. Il est par exemple possible de se servir des électrodes métalliques de l'OLED comme miroirs réfléchissants de la cavité (Takada 1993, Berggren 1996, Sun 2005, Peng 2006, Han 2005). La réalisation de la cavité ne demande alors pas le dépôt de couches supplémentaires : l'ajustement de l'épaisseur des électrodes permet de contrôler les coefficients de réflexion et de transmission de la couche métallique,
- et enfin, qu'il est possible de modéliser les effets de ces cavités par un formalisme classique et une configuration en cavité asymétrique présentée au paragraphe 2.1.3. Ces modèles permettent de simuler à la fois le couplage du signal de fluorescence dans un substrat stratifié et de modéliser l'émission d'une OLED à l'intérieur d'une cavité.

L'insertion d'une OLED à l'intérieur d'une cavité Fabry Péroต์ peut être réalisée de deux manières et ont toutes

fait l'objet d'études par la communauté scientifique :

- la cavité peut être réalisée par un miroir métallique totalement réfléchissant et un miroir semi-réfléchissant constitué par un empilement de couches minces diélectriques (voir Figure 2.22 (a)) (Nakayama 1993, Tsutsui 1994, Dodabalapur 1994 a, Dodabalapur 1994 b, Fisher 1995, Lemmer 1995, Dodabalapur 1996, Dirr 1997). Dans ce cas le miroir métallique sert aussi de cathode pour l'injection des électrons dans les couches organiques. L'anode doit, quant à elle, être transparente afin de laisser passer la lumière. Elle est généralement réalisée en ITO,
- l'autre configuration consiste à utiliser deux miroirs métalliques dont l'un est semi-réfléchissant (Takada 1993, Berggren 1996, Sun 2005, Han 2005, Peng 2006). Dans ce cas, les deux miroirs sont aussi utilisés comme électrodes pour l'injection des porteurs de charge dans l'OLED (voir Figure 2.22 (b)).

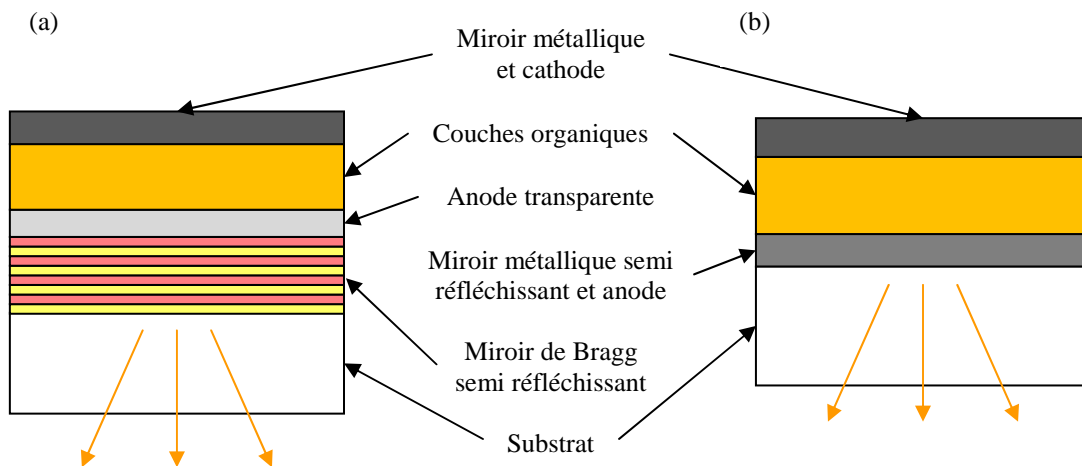


Figure 2.22. Structures possibles d'OLED à l'intérieur d'une cavité de type Fabry Péro. a : cavité constituée d'un miroir de Bragg et d'un miroir métallique servant aussi de cathode. b : cavité constituée de deux miroirs métalliques servant en même temps d'électrodes.

Nous verrons dans la suite de ce mémoire que nous avons été amenés à tester ces deux configurations différentes dans le cadre de nos travaux. Toutefois, les études des effets d'une cavité Fabry Péro ont été principalement réalisées sur des structures asymétriques (voir Figure 2.22 a).

2.4. Présentation du modèle utilisé

Dans ce paragraphe, nous allons définir les notations utilisées dans la suite du mémoire pour la mise en place des modèles théoriques permettant de simuler les propriétés d'émission d'un dipôle dans une cavité asymétrique. Nous justifierons ensuite notre choix d'utiliser une approche classique basée sur une décomposition en ondes planes du champ émis par un dipôle pour la résolution de notre problème. Enfin, nous présenterons le formalisme utilisé afin de calculer les coefficients de Fresnel permettant de décrire la réflexion et la transmission d'une onde plane à travers un milieu pouvant être constitué par un empilement de couches minces.

2.4.1. Notations et conventions

Nous utiliserons les notations usuelles de l'électromagnétisme pour désigner les constantes et paramètres classiquement utilisés.

Ainsi :

- c désigne la vitesse de la lumière dans le vide (m.s^{-1}),
- ε_0 et ε_r représentent respectivement la permittivité diélectrique du vide et la permittivité diélectrique relative du milieu étudié (ε_0 est exprimé en F.m^{-1} et ε_r est adimensionnel). μ_0 et μ_r représentent, quant à eux, la perméabilité magnétique du vide et celle relative du milieu considéré (μ_0 est exprimé en H.m^{-1} et μ_r est adimensionnel),
- $n = \sqrt{\mu_r \cdot \varepsilon_r}$ est l'indice de réfraction du milieu. Cet indice peut être réel (cas des milieux transparents) ou complexe (cas des milieux métalliques par exemple).
- λ représente la longueur d'onde dans le vide, λ_{exc} et λ_{em} étant respectivement les longueurs d'onde dans le vide d'excitation et d'émission du luminophore considéré (exprimé en m),
- $\omega = \frac{2\pi}{\lambda}$ représente la pulsation d'une onde à la longueur d'onde λ (exprimé en rad.s^{-1}),
- k représente le vecteur d'onde d'une onde plane et $\|\mathbf{k}_v\| = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{\omega}{c}$ est sa valeur dans le vide,

De manière générale, tous les milieux que nous considérerons dans ce mémoire seront considérés isotropes, linéaires, homogènes et non magnétiques ($\mu_r = 1$) car nous travaillons à des fréquences optiques. Ils seront entièrement décrits à partir de leur indice de réfraction complexe n , et de leurs formes géométriques (en particulier leurs épaisseurs dans le cas de milieux semi-infinis).

Les vecteurs seront notés en gras et nous utiliserons la lettre \mathbf{e} pour désigner les vecteurs unitaires : $\mathbf{e}_x, \mathbf{e}_y, \mathbf{e}_z$.

Nous utiliserons les lettres \mathbf{E} et \mathbf{H} afin de désigner les champs électrique et magnétique se propageant dans un milieu donné. Les ondes électromagnétiques étudiées peuvent être décomposées sur une base d'ondes harmoniques qui, en notation complexe, peuvent s'écrire sous la forme :

$$\mathbf{U}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{U}(\mathbf{r})e^{i\omega t} \quad \text{Eq. 2.16.}$$

Dans un souci de simplification, la dépendance temporelle de l'onde ne sera plus évoquée par la suite.

2.4.1.2. Systèmes de coordonnées et repères utilisés

Pour le dipôle

Un dipôle sera désigné par la lettre $\boldsymbol{\mu}$. Les coordonnées de position et d'orientation du dipôle sont $\mathbf{r}_\mu = (\theta, \varphi, z_\mu)$, où θ désigne l'angle polaire (angle entre le dipôle et la normale à la surface \mathbf{e}_z), φ l'angle azimutal (angle entre la projection du dipôle sur l'interface et un axe arbitraire ce sur même plan), et z_μ l'altitude du dipôle au dessus de l'interface. L'interface est, quant à elle, représentée par le plan (Oxy).

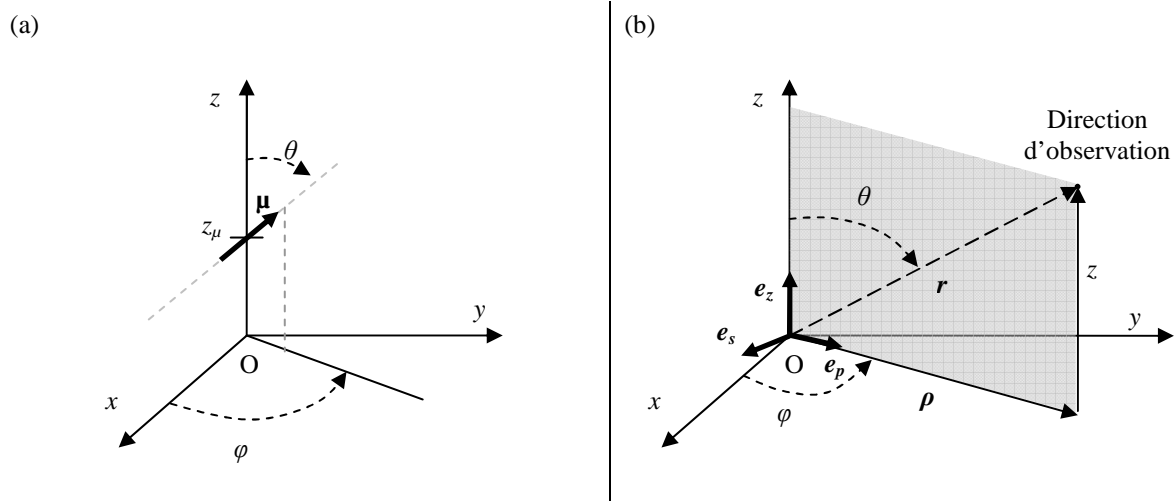


Figure 2.23. Systèmes de coordonnées et notations. (a) Pour les dipôles d'absorption et d'émission. (b) Pour la direction d'observation qui est représentée par r .

Les dipôles d'absorption et d'émission seront désignés μ_a et μ_e respectivement, et leurs coordonnées correspondantes $(\theta_a, \varphi_a, z_{\mu})$ et $(\theta_e, \varphi_e, z_{\mu})$. On utilisera les notations $(\theta_{\mu}, \varphi_{\mu}, z_{\mu})$ pour désigner un dipôle quelconque.

Classiquement, deux orientations particulières du dipôle par rapport à l'interface seront utilisées : parallèle et perpendiculaire à l'interface. Nous désignerons alors ces orientations par les indices $//$ et \perp respectivement. Toutes les orientations de dipôle pourront être décomposées suivant ces orientations particulières : perpendiculaire et parallèle à l'interface. Une population de dipôles orientés de façon isotrope pourra par exemple être considérée comme étant un ensemble de dipôles dont $1/3$ sont orientés perpendiculairement à l'interface et $2/3$ parallèlement à l'interface (Hellen 1987, Barnes 1998, Benisty 1998 a, Barritault 2002) :

$$ISO = \frac{1}{3} \perp + \frac{2}{3} // \quad \text{Eq. 2.17.}$$

Pour l'observateur

L'intensité rayonnée par un dipôle sera calculée en fonction d'un point d'observation dont la position sera repérée en coordonnées sphériques par (r, θ, φ) et en coordonnées cylindriques par $r = \rho + ze_z$ (voir Figure 2.23 (b)).

On définit alors, à partir de ce point d'observation, un plan d'observation formé par l'axe (Oz) et le point d'observation ainsi qu'un repère direct associé à ce plan : (O, e_s, e_p, e_z) où :

- e_s est le vecteur unitaire parallèle à l'interface et perpendiculaire au plan d'observation,
- e_p est le vecteur unitaire parallèle à l'interface et au plan d'observation,
- e_z est le vecteur unitaire perpendiculaire au plan de l'interface.

Afin de simplifier leur traitement, les calculs utiliseront trois orientations particulières de dipôle pour permettre de simuler l'ensemble des orientations possibles d'un dipôle au-dessus d'une interface. Les orientations de dipôles que nous utiliserons sont :

- parallèles à l'interface, c'est-à-dire d'orientation suivant e_s et e_p . Les notations que nous utiliserons pour désigner ces deux orientations de dipôle seront μ_s et μ_p ,

- perpendiculaire à l'interface, c'est-à-dire suivant \mathbf{e}_z . Cette orientation sera désignée par μ_z .

Une population de dipôles orientés de manière isotrope dans l'espace pourra alors être simulée par un dipôle d'orientation :

$$\mu_{ISO} = \frac{1}{3}(\mu_s + \mu_p + \mu_z) \quad \text{Eq. 2.18.}$$

Pour le vecteur d'onde

La symétrie de révolution autour de l'axe Oz des cavités asymétriques que nous nous proposons d'étudier nous permet d'utiliser les coordonnées cylindriques pour exprimer le vecteur d'onde \mathbf{k} . Il s'écrira de la manière suivante : $\mathbf{k} = \mathbf{k}_r + k_z \mathbf{e}_z$ où \mathbf{k}_r est la composante radiale, c'est-à-dire parallèle à l'interface, et k_z la composante normale à l'interface de ce vecteur d'onde.

La valeur du vecteur d'onde dans un milieu d'indice n est donnée par :

$$k = n \frac{2\pi}{\lambda} = \sqrt{k_r^2 + k_z^2} \quad \text{Eq. 2.19.}$$

2.4.1.3. Cavités asymétriques (notations)

Les numérotations qui seront utilisées tout au long de ce mémoire pour désigner les différents milieux d'une cavité asymétrique sont celles de la Figure 2.24

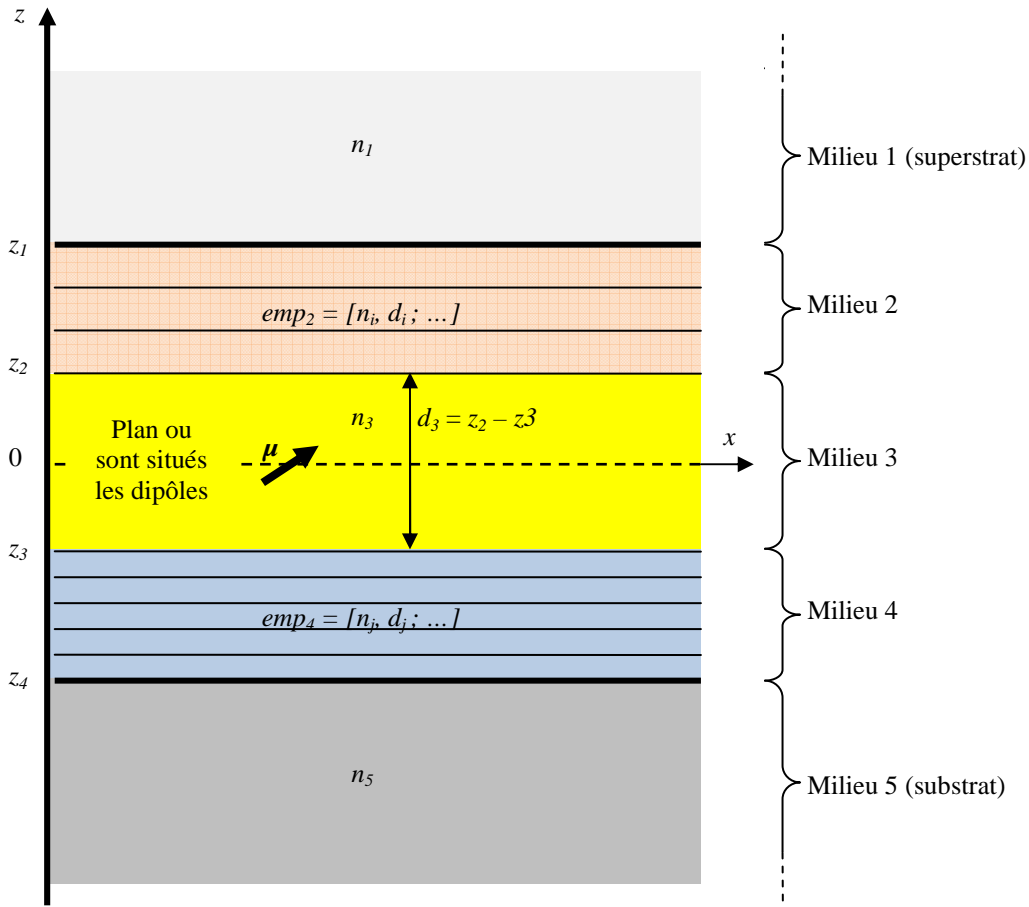


Figure 2.24. Numérotation des différents milieux d'une cavité planaire asymétrique. Le superstrat (milieu 1) et le substrat (milieu 5) sont supposés semi-infinis et sont entièrement caractérisés par leurs indices de réfraction complexes n_1 et n_5 . emp_2 et emp_4 représentent les matrices contenant les épaisseurs et indices de réfraction des différentes couches minces constituant les milieux 2 et 4. Les hauteurs z_1 , z_2 , z_3 et z_4 définissent respectivement la position des interfaces entre les milieux 1 et 2, 2 et 3, 3 et 4 et enfin 4 et 5. Les dipôles sont quant à eux positionnés sur le plan (xOy) (c'est-à-dire à $z = 0$).

Dans les sections suivantes, nous chercherons à calculer l'énergie rayonnée par un dipôle dans les milieux 1, 3 et 5 en fonction de l'angle d'observation et de sa longueur d'onde d'émission. Dans ces calculs, la nature des milieux 2 et 4 n'apparaît qu'à travers leurs coefficients de réflexion et de transmission $(r_2^s, r_2^p, t_2^s, t_2^p)$ et $(r_4^s, r_4^p, t_4^s, t_4^p)$ où s et p représentent respectivement les polarisations TE et TM d'une onde plane et correspondent aux orientations selon les vecteurs e_s et e_p définis dans le paragraphe précédent. Ainsi, que ces milieux soient constitués par une seule couche ou par un empilement de plusieurs couches minces, le problème se traitera de la même manière : seuls leurs coefficients de réflexion et de transmission changeront.

Lors de l'étude du couplage et du confinement d'un signal de fluorescence dans une couche mince déposée à la surface d'une lame de verre, le milieu 4 sera le plus souvent une simple couche. Nous définirons celle-ci à partir de son indice de réfraction et de son épaisseur (n_4, d_4).

2.4.1.4. Approche classique basée sur une décomposition en ondes planes

Plusieurs approches théoriques ont été développées dans la littérature afin d'étudier les propriétés d'émission d'un dipôle en fonction de son environnement extérieur. Ces théories se basent soit sur une approche classique, soit sur une approche quantique de l'électromagnétisme.

Les approches quantiques (Deppe 1991 a et b, Björk 1991) considèrent que les interfaces à proximité du dipôle modifient la force des fluctuations du vide d'origine quantique, fluctuations qui interagissent avec le dipôle émetteur (dans l'analogie de la Figure 2.4, ces fluctuations sont représentées par les périodes d'oscillation du ressort). Ce type d'approche est très utile pour décrire les interactions à très faible distance ($< 10 \text{ \AA}$), mais n'apporte pas d'élément supplémentaire par rapport aux approches classiques pour des distances plus grandes. Les distances que nous considérons étant de l'ordre du nm, nous n'utiliserons pas ce type d'approche.

Les approches classiques se basent toutes sur la résolution des équations de Maxwell mais utilisent des formalismes différents pour décrire les champs \mathbf{E} et \mathbf{H} émis par le dipôle :

- le formalisme du vecteur de Hertz. Il a été en premier utilisé par Sommerfeld et al (Sommerfeld 1909) pour étudier l'émission d'une antenne au dessus de la terre puis a été appliqué aux problèmes de molécules fluorescentes par de nombreuses équipes (Chance 1975, Chance 1978, Lukosz 1980, Neyts 1998),
- le formalisme de Green Dyadique (Chance 1978, Sullivan 1997, Novotny 1997). Il repose sur une approche tensorielle des équations de Maxwell puisque dans ce cadre, la fonction de Green est matricielle,
- la décomposition en ondes planes de l'émission du dipôle. Weyl et al. (Weyl 1919.) a le premier développé une technique basée sur une telle décomposition pour les problèmes d'antenne. Ce formalisme a ensuite été repris pour des longueurs d'ondes optiques et détaillé pour des problématiques diverses (Lukosz 1977 a, Lukosz 1977 b, Lukosz 1979, Lukosz 1981, Sipe 1981, Ford 1984, Hellen 1987, Rigneault 1996, Benisty 1998 a).

C'est cette dernière approche que nous avons choisie d'utiliser afin de modéliser les propriétés d'émission d'un dipôle dans une cavité asymétrique (Figure 2.24). En effet cette méthode présente plusieurs avantages pour la modélisation de ce type de configurations planaires :

- elle permet d'utiliser directement les coefficients de réflexion et de transmission de Fresnel simplifiant le traitement d'un grand nombre d'interfaces. En effet, le calcul de ces coefficients peut être réalisé par une approche matricielle (voir § 2.4.2) ce qui permet de prendre en compte plus simplement des empilements de couches minces pouvant, par exemple, constituer un des miroirs d'une cavité Fabry Péro (voir Figure 2.22),
- elle permet de distinguer facilement les phénomènes concernant les modes propagatifs de ceux concernant les modes évanescents émis par le dipôle. Ils sont en effet responsables respectivement de la modification des propriétés d'émission d'une OLED par une cavité Fabry Péro et du couplage en champ proche de l'émission de fluorophore dans une lame de verre.

Cette méthode de décomposition en ondes planes consiste à exprimer le champ $\mathbf{E}(\mathbf{r})$ émis par le dipôle dans l'espace réciproque de Fourier ou espace des vecteurs d'ondes \mathbf{k} :

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \iiint \mathbf{E}_k e^{-i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} d^3\mathbf{k} \quad \text{Eq. 2.20.}$$

où $\mathbf{k} = \mathbf{k}_r + k_z \mathbf{z}$ représente un vecteur d'onde décomposé suivant le plan de l'interface et la direction normale \mathbf{z} à cette interface, et $d^3\mathbf{k} = dk_r dk_z$ (voir Figure 2.23). \mathbf{E}_k représente le champ électrique d'une onde plane se propageant dans la direction définie par le vecteur d'onde \mathbf{k} .

A chaque composante (onde plane) de cette décomposition est associé un vecteur d'onde qui vérifie l'équation

$$k_r^2 + k_z^2 = \left(\frac{2\pi n}{\lambda} \right)^2, \text{ où } n \text{ est l'indice du milieu considéré. Cette équation nous permet alors de distinguer les}$$

deux phénomènes d'émission d'un dipôle :

- les ondes propagatives pour lesquelles les vecteurs d'onde associés ont toutes leurs composantes dans l'espace réel : $k_r \leq n \frac{2\pi}{\lambda}$,
- les ondes évanescentes pour lesquelles les vecteurs d'onde ont au moins une de leurs composantes dans l'espace imaginaire pur : $k_r > n \frac{2\pi}{\lambda}$.

2.4.2. Calcul des coefficients de Fresnel

La décomposition en ondes planes de l'émission du dipôle offre la possibilité d'utiliser les coefficients de Fresnel car ils définissent les propriétés de réflexion et de transmission d'une onde plane sur une interface entre deux milieux α et β .

Ces coefficients sont définis pour deux polarisations rectilignes particulières de l'onde incidente permettant de simuler l'ensemble des polarisations possibles d'une onde plane (voir Figure 2.25) :

- **la polarisation s** pour laquelle le champ électrique incident est polarisé perpendiculairement au plan d'incidence,
- **la polarisation p** pour laquelle le champ magnétique associé au champ électrique incident est polarisé perpendiculairement au plan d'observation.

Ces deux polarisations de l'onde plane incidente sont usuellement appelées ondes TE et TM (pour Transverse Electrique et Transverse Magnétique), mais nous utiliserons les notations s et p pour les désigner dans la suite de ce rapport.

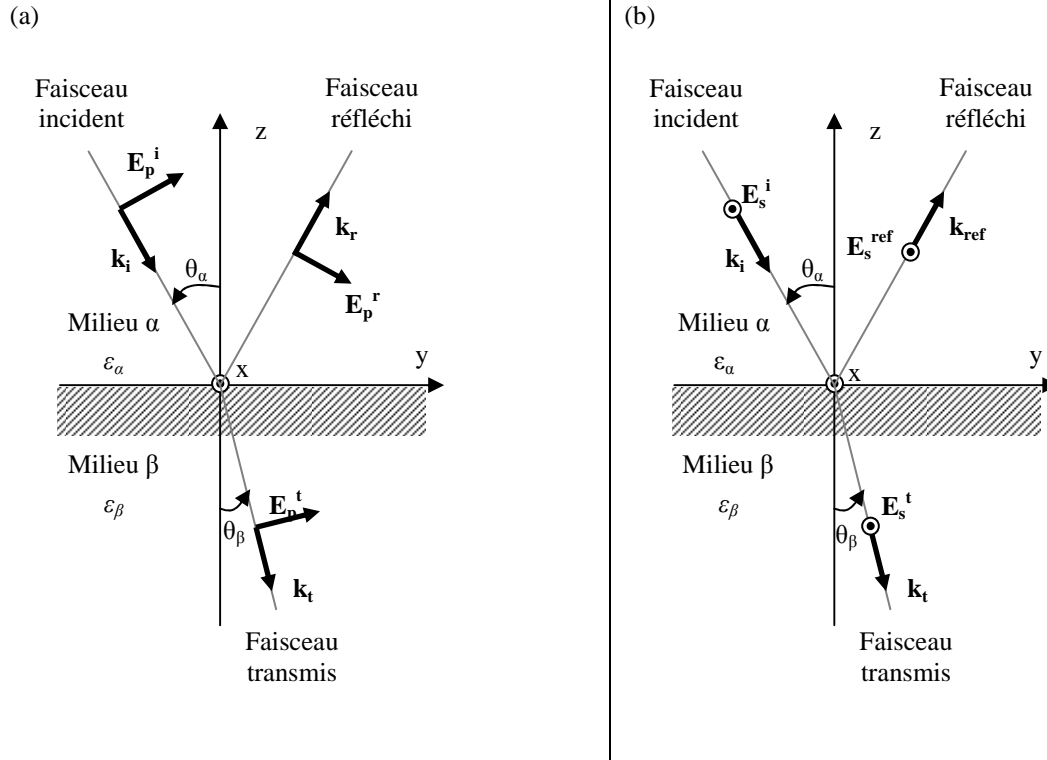


Figure 2.25. Réflexion et réfraction d'une onde plane monochromatique polarisée rectilignement. (a) : cas d'une polarisation incidente p; (b) : cas d'une polarisation incidente s.

La continuité des composantes tangentielles des champs électriques et magnétiques permet alors de déterminer les relations liant le champ incident aux champs transmis et réfléchi, c'est-à-dire les coefficients de réflexion et de transmission pour les deux polarisations considérées :

$$\begin{aligned}
 r_s &= \frac{n_\alpha \cos \theta_\alpha - n_\beta \cos \theta_\beta}{n_\alpha \cos \theta_\alpha + n_\beta \cos \theta_\beta} & r_p &= \frac{n_\alpha \cos \theta_\beta - n_\beta \cos \theta_\alpha}{n_\alpha \cos \theta_\beta + n_\beta \cos \theta_\alpha} \\
 t_s &= \frac{2n_\alpha \cos \theta_\alpha}{n_\alpha \cos \theta_\alpha + n_\beta \cos \theta_\beta} & t_p &= \frac{2n_\alpha \cos \theta_\alpha}{n_\alpha \cos \theta_\beta + n_\beta \cos \theta_\alpha}
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 2.21.}$$

Où n_α et n_β désignent respectivement les indices de réfraction des milieux α et β, et θ_α et θ_β représentent les angles d'incidence par rapport à l'axe (Oz) des ondes planes dans les milieux α et β.

$$\begin{aligned}
 k_{z\alpha} &= \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} n_\alpha^2 - k_r^2} = k_v n_\alpha \cos \theta_\alpha \\
 k_{z\beta} &= \sqrt{\frac{\omega^2}{c^2} n_\beta^2 - k_r^2} = k_v n_\beta \cos \theta_\beta
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 2.22.}$$

Cas d'un multi couches

Dans le cas d'un empilement de plusieurs couches minces, un formalisme matriciel sera utilisé pour déterminer les propriétés de réflexion et de transmission de l'ensemble de ces couches. Nous utiliserons le formalisme matriciel développé et décrit par P. Yeh (Yeh 1988).

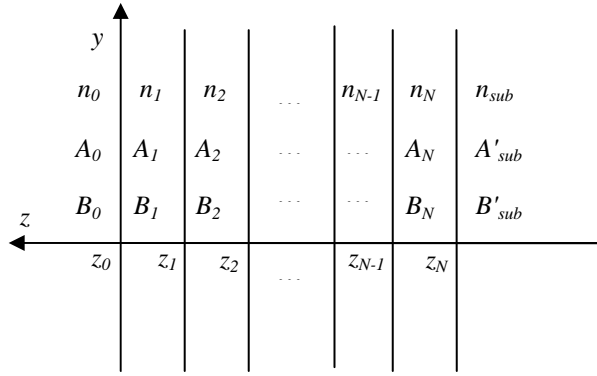


Figure 2.26. Schéma représentant un empilement de couches minces diélectriques.

Soit un empilement de N couches minces d'épaisseur d_j et d'indice n_j ($j \in [1, N]$) représenté sur la Figure 2.26. La relation liant les amplitudes A_0 et B_0 avec les amplitudes A'_{sub} et B'_{sub} qui représentent respectivement les amplitudes des champs dans les milieux 0 et sub aux abscisses z_0^+ et z_N^- se propageant vers les z positifs (A) et vers les z négatifs (B) est :

$$\begin{pmatrix} A_0 \\ B_0 \end{pmatrix} = (D_0)^{-1} \left[\prod_{l=1}^N D_l P_l D_l^{-1} \right] D_{sub} \begin{pmatrix} A'_{sub} \\ B'_{sub} \end{pmatrix} \quad \text{Eq. 2.23.}$$

Où :

$$- D_l^s = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ n_l \cos \theta_l & -n_l \cos \theta_l \end{pmatrix} \text{ pour des ondes polarisées suivant s,} \quad \text{Eq. 2.24.}$$

$$- D_l^p = \begin{pmatrix} \cos \theta_l & \cos \theta_l \\ n_l & -n_l \end{pmatrix} \text{ pour des ondes polarisées suivant p,} \quad \text{Eq. 2.25.}$$

$$- \text{et } P_l = \begin{pmatrix} e^{i\varphi_l} & 0 \\ 0 & e^{-i\varphi_l} \end{pmatrix} \text{ avec } \varphi_l = k_{z_l} d_l \quad \text{Eq. 2.26.}$$

La réfraction d'une onde entre un milieu $l-1$ et un milieu l est alors représentée par le produit matriciel $D_{l-1}^{-1} D_l$, et la matrice P_l la propagation de l'onde à travers de la couche l .

Ce formalisme sera utilisé pour calculer les coefficients de réflexion et de transmission entre deux milieux dans l'ensemble des modèles qui seront développés dans la suite de ce rapport.

Intérêt d'utiliser les coefficients de réflexion et de transmission de Fresnel

L'utilisation des coefficients de réflexion et de transmission de Fresnel présente plusieurs avantages pour décrire les propriétés d'émission de dipôles dans une cavité asymétrique.

Tout d'abord, le formalisme matriciel pour le calcul de ces coefficients permet de fortement simplifier le traitement des configurations présentant de nombreuses interfaces comme ce sera le cas des cavités Fabry Péroต์ constituées d'un ou deux miroirs réalisés par un empilement de couches minces diélectriques.

D'autre part, l'utilisation de ces coefficients permet de prendre en compte les propriétés optiques des différents

milieux considérées. En effet, ces coefficients tiennent compte aussi bien de l'amplitude que de la phase de l'onde grâce à l'utilisation des permittivités complexes des différents milieux considérés, contrairement aux méthodes basées uniquement sur la phase des ondes et qui donc ne prennent pas en compte l'absorption de ces milieux. Cela est en particulier important si l'on considère des milieux fortement absorbants comme les milieux métalliques. De plus, cela nous permettra de simplifier les notations puisque les coefficients de réflexion (r) et de transmission (t) prennent en compte aussi bien les modifications de phase que les modifications d'amplitude d'une onde lors de son passage d'un milieu α à un milieu β .

2.5. Mise en place des modèles théoriques

Ce paragraphe a pour but de présenter les différents modèles qui ont été développés et utilisés au cours du travail de thèse décrit dans ce mémoire.

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à la modélisation de la puissance d'excitation d'un dipôle par une onde électromagnétique externe. Nous développerons ensuite plusieurs approches afin d'étudier les propriétés d'émission d'un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité asymétrique.

Une première approche permettra de modéliser les propriétés d'émission radiative d'un dipôle en fonction des propriétés de la cavité dans laquelle il est situé et de sa longueur d'onde d'émission. Cela nous permettra d'étudier les effets d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED ainsi que la collecte de la fluorescence dans une simple lame de verre.

Le besoin de connaître les différentes voies de relaxations radiatives ou non du dipôle nous amènera ensuite à mettre au point un formalisme permettant de calculer la puissance totale émise par le dipôle et de différencier ces différentes voies de dé-excitation. En effet, l'étude de la collecte de la fluorescence dans un substrat stratifié pouvant contenir un milieu absorbant, comme le silicium, demande de pouvoir estimer la quantité d'énergie émise dans les modes guidés supportés par ce substrat ainsi que les pertes de signal dans le milieu absorbant.

Les résultats inattendus obtenus par cette méthode nous amèneront enfin à développer un dernier modèle permettant de calculer plus précisément l'énergie émise dans les modes guidés d'un substrat stratifié. Ces résultats feront l'objet d'une étude expérimentale décrite dans le chapitre 3 (voir § 3.3.4.4).

2.5.1. Puissance d'excitation

Dans le paragraphe 2.2 nous avons évoqué les deux phénomènes physiques qui influent sur le phénomène d'absorption par un dipôle μ_e excité par un champ E_{exci} et situé à l'intérieur d'une cavité asymétrique :

- l'orientation du dipôle vis-à-vis de la direction de polarisation du champ exciteur E_{exci} . Le dipôle pourra absorber d'autant plus d'énergie que son orientation est colinéaire à la polarisation du champ exciteur, c'est le principe de "photo-sélection",
- l'effet du milieu extérieur sur le champ exciteur. La présence d'interfaces peut créer un phénomène d'onde stationnaire modulant la puissance d'excitation $\|E_{exci}\|^2$ suivant la position du dipôle.

Ces deux principes peuvent être pris en compte à travers l'équation suivante :

$$A \propto |\mu_e \cdot E_{exci}|^2 \quad \text{Eq. 2.27.}$$

où A représente la probabilité qu'a le luminophore d'absorber un photon et E_{exi} est le champ excitateur au niveau du dipôle. Cette formule est généralement utilisée dans les ouvrages traitant de l'excitation de luminophore (Hellen 1987, Barritault 2002) et découle de la règle d'or de Fermi (Fermi 1932) qui donne le taux de transition entre deux niveaux d'énergie.

2.5.2. Calcul du diagramme d'émission

Intéressons nous ici à l'énergie radiative émise par un dipôle dans une cavité asymétrique et, plus précisément, à sa répartition spatiale. De nombreux travaux ont été menés sur ce sujet, que ce soit pour simuler l'émission d'un dipôle situé au-dessus d'un matériau massif recouvert ou non par un empilement de couches minces (Lukosz 1977 a, Lukosz 1977 b, Lukosz 1979, Ford 1984, Hellen 1987, Enderlein 1999), ou bien situé à l'intérieur d'une cavité de type Fabry Pérot (Lukosz 1980, Lukosz 1981, Rigneault 1996, Rigneault 1997, Rigneault 1998, Benisty 1998 a, Benisty 1998 b, Benisty 1998 c, Polarecky 2000). Ces méthodes se basent sur une approche classique de l'électromagnétisme et une décomposition en ondes planes de l'émission du dipôle permettant l'utilisation des coefficients de réflexion et de transmission de Fresnel.

Nous allons présenter ici une méthode qui permet, par un formalisme commun, de calculer le diagramme d'émission d'un dipôle dans les deux configurations suivante :

- un dipôle situé au-dessus d'un matériau massif recouvert ou non par un empilement de couches minces,
- un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité planaire de type Fabry Pérot.

Cette méthode, décrite par Benisty et al. (Benisty 1998 a), repose sur l'utilisation de termes sources et un formalisme matriciel afin de calculer le champ émis par le dipôle dans les milieux extérieurs de la structure (d'après nos notations, les milieux 1 et 5 : voir Figure 2.24).

Dans les paragraphes suivants, nous allons décrire brièvement cette méthode en présentant les termes sources et le calcul matriciel utilisé par Benisty et al. Nous discuterons ensuite des limitations de cette méthode qui nous ont poussé à développer un autre modèle afin de décrire l'ensemble des voies de relaxation possibles du dipôle.

2.5.2.1. Définition des termes sources et présentation de la méthode de calcul

Afin de simplifier les calculs, Benisty et al. (Benisty 1998 a) utilise une combinaison de termes sources permettant de représenter la répartition des ondes planes émises par un dipôle en fonction de son orientation. En effet, l'émission d'un dipôle dans un milieu infini étant connu, il est possible de définir des fonctions permettant de modéliser son émission. Ces fonctions reviennent à donner un poids à un ensemble d'ondes planes afin de simuler la décomposition en ondes planes de l'émission d'un dipôle en fonction de son orientation.

Ces termes sources sont ensuite introduit comme une perturbation locale du champ électrique se propageant dans la cavité au niveau du plan où sont situés les dipôles. En effet, à chaque altitude z , le champ peut être décomposé comme étant la somme de deux champs contrapropagatifs (voir Figure 2.27). La perturbation créée par l'émission des dipôles situés à l'intérieur de la cavité se traduit alors par la relation suivante :

$$\begin{pmatrix} E_{31,\uparrow} \\ E_{31,\downarrow} \end{pmatrix}_{s,p} - \begin{pmatrix} E_{35,\uparrow} \\ E_{35,\downarrow} \end{pmatrix}_{s,p} = \begin{pmatrix} A_{\uparrow} \\ A_{\downarrow} \end{pmatrix}_{s,p} \quad \text{Eq. 2.28.}$$

où $E_{31,\uparrow\uparrow}$ et $E_{35,\uparrow\downarrow}$ représentent les champs électriques en $z = 0^+$ et $z = 0^-$, et $A_{\uparrow\downarrow}$ sont les termes sources en amplitude simulant l'émission des dipôles (voir Figure 2.27).

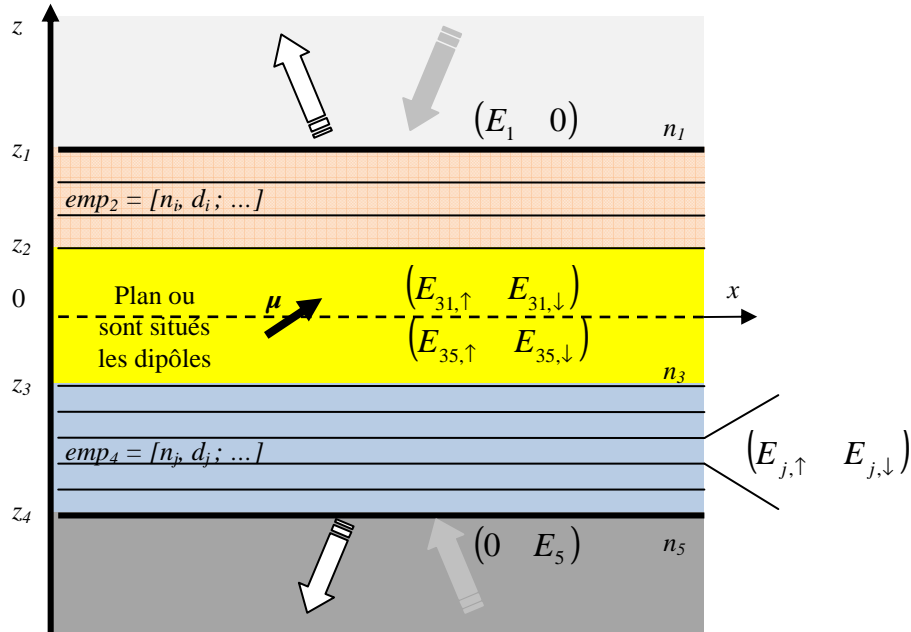


Figure 2.27. Schéma d'une cavité asymétrique à l'intérieur de laquelle sont situés les dipôles (en $z = 0$) et représentation du formalisme matriciel permettant de décrire la propagation du champ électrique dans la cavité. Si le champ provient uniquement des dipôles, seuls les champs extraits sont non nuls.

Trois configurations de dipôles sont considérées afin de pouvoir prendre en compte l'ensemble des orientations possibles de dipôles :

- un dipôle vertical dont toutes ses ondes émises sont Transverse Magnétique (c'est-à-dire de polarisation p) (voir Figure 2.28 (a)),
- un dipôle horizontal qui est décomposé suivant les deux configurations suivantes :
 - un dipôle horizontal émettant des ondes Transverse Magnétique (c'est-à-dire de polarisation p) (voir Figure 2.28 (b)),
 - un dipôle horizontal émettant des ondes Transverse Electrique (c'est-à-dire de polarisation s) (voir Figure 2.28 (c)),

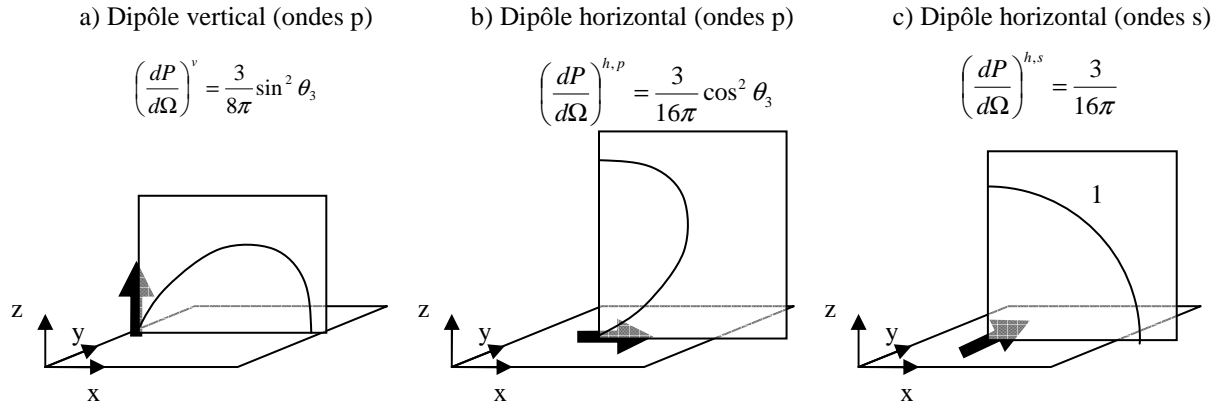


Figure 2.28. Diagramme d'émission de (a) un dipôle vertical émettant dans les modes p (ou TM), (b) un dipôle horizontal émettant dans les modes p (ou TM) et (c) un dipôle horizontal émettant dans les modes s (ou TE). Le dipôle est situé dans le milieu 3 et l'angle θ_3 est l'angle par rapport à la normale z . Est indiquée la puissance émise par unité d'angle solide de ces dipôles dans ces trois configurations.

Ces termes sources sont ensuite exprimés en fonction de k_z et $k_{//}$ afin de prendre en compte aussi bien les ondes propagatives que les ondes évanescentes (en faisant varier $k_{//}$ de 0 à $+\infty$). En considérant la continuité du champ H et la discontinuité du champ E suivant z , Benisty et al. (Benisty 1998 a) trouve finalement les termes sources en amplitude suivants :

Dipôle	Mode	
	TE (s)	TM (p)
Horizontal	$A_{\uparrow,\downarrow}^{h,s} = \pm \sqrt{\frac{3}{16\pi}}$	$A_{\uparrow,\downarrow}^{h,p} = \pm \sqrt{\frac{3}{16\pi}} \frac{k_{z,1}}{k_1}$
Vertical	$A_{\uparrow,\downarrow}^{v,s} = 0$	$A_{\uparrow,\downarrow}^{v,p} = \pm \sqrt{\frac{3}{8\pi}} \frac{k_{//}}{k_1}$

Table 2.2 Termes sources en amplitude définis pour des dipôles orientés horizontalement ou verticalement par rapport aux interfaces de la cavité (d'après Benisty 1998 a). Les flèches \uparrow et \downarrow représentent la propagation de l'onde vers les z positifs et négatifs respectivement.

2.5.2.2. Calcul des champs dans les milieux 1 et 5

Afin de calculer les champs émis par le dipôle dans les milieux 1 et 5 (voir Figure 2.27) il est, à présent, nécessaire de faire propager les différentes ondes planes émises par le dipôle dans la cavité. Pour cela, Benisty et al. utilise un formalisme matriciel reliant, pour chacune des polarisations et orientations de dipôle, les champs dans les milieux 1 et 5 et le champ au niveau du plan des dipôles :

$$\begin{aligned}
A_{s,p} \begin{pmatrix} E_1 \\ 0 \end{pmatrix}_{s,p}^{v,h} &= \begin{pmatrix} E_{31,\uparrow} \\ E_{31,\downarrow} \end{pmatrix}_{s,p}^{v,h} \\
B_{s,p} \begin{pmatrix} 0 \\ E_5 \end{pmatrix}_{s,p}^{v,h} &= \begin{pmatrix} E_{35,\uparrow} \\ E_{35,\downarrow} \end{pmatrix}_{s,p}^{v,h}
\end{aligned}
\tag{Eq. 2.29.}$$

où $A_{s,p}$ représente la matrice de propagation entre le milieu 1 à l'altitude $z = z_1$ et le milieu 3 à l'altitude $z = 0^+$ pour des ondes polarisées s ou p, et $B_{s,p}$ la matrice de propagation entre le milieu 5 à l'altitude $z = z_5$ et le milieu 3 à l'altitude $z = 0^-$.

Le formalisme matriciel décrit par P. Yeh (Yeh 1988) et présenté au paragraphe 2.4.2 permet d'exprimer les matrices $A_{s,p}$ et $B_{s,p}$ sous la forme :

$$\begin{aligned}
A_{s,p} &= P_3 D_{3,sp}^{-1} \left[\prod_{emp31} D_{j,sp} P_j D_{j,sp}^{-1} \right] D_{1,sp} \\
B_{s,p} &= P_3^{-1} D_{3,sp}^{-1} \left[\prod_{emp35} D_{j,sp} P_j D_{j,sp}^{-1} \right] D_{5,sp}
\end{aligned}
\tag{Eq. 2.30.}$$

où P_3 représente la matrice de propagation dans le milieu 3 de l'altitude $z = z_2$ à l'altitude $z = 0^+$ et $P_{3'}$ la matrice de propagation dans le milieu 3 de l'altitude $z = z_3$ à l'altitude $z = 0^-$. Les expressions des matrices P et D sont données au paragraphe 2.4.2.

La résolution du système d'équations 2.18 et 2.19 permet finalement d'exprimer les champs E_1 et E_5 dans les milieux 1 et 5 à partir des termes sources $A_{\uparrow,\downarrow}$ et des coefficients des matrices A et B :

$$\begin{aligned}
E_1 &= \frac{b_{22}A_{\uparrow} - b_{12}A_{\downarrow}}{a_{11}b_{22} - a_{21}b_{12}} = \frac{t_{31}(A_{\uparrow} - r_{35}A_{\downarrow})}{1 - r_{35}r_{31}} \\
E_5 &= \frac{a_{21}A_{\uparrow} - a_{11}A_{\downarrow}}{a_{11}b_{22} - a_{21}b_{12}} = \frac{t_{35}(r_{31}A_{\uparrow} - A_{\downarrow})}{1 - r_{35}r_{31}}
\end{aligned}
\tag{Eq. 2.31.}$$

où a_{ij} et b_{ij} sont les coefficients des matrices A et B, et t_{31} , r_{31} , t_{35} et r_{35} sont les coefficients de Fresnel de transmission et de réflexion entre les milieux 1 et 3 (à l'altitude $z = 0^+$) et les milieux 5 et 3 (à l'altitude $z = 0^-$) respectivement. Ces coefficients sont définis par les relations suivantes (Yeh 1988) :

$$t_{31} = \frac{1}{a_{11}}, \quad t_{35} = \frac{1}{b_{22}}, \quad r_{31} = \frac{a_{21}}{a_{11}}, \text{ et } r_{35} = \frac{b_{12}}{b_{22}}
\tag{Eq. 2.32.}$$

On observe alors à partir des relations 2.24 que le champ émis vers le milieu 1 est la somme :

- du champ directement transmis par le milieu 2,
- et du champ réfléchi par le milieu 4 puis transmis par le milieu 2,

et inversement pour le champ émis vers le milieu 5.

Le dénominateur $1 - r_{35}r_{31}$ représente quant à lui le facteur de qualité de la cavité et est responsable des effets d'inhibition ou d'augmentation de certains modes par la structure.

Par ailleurs, les modes guidés supportés par la structure sont entièrement confinés à l'intérieur de la cavité et ont donc des coefficients de réflexion r_{31} et r_{35} égal à 1. Ce sont les pôles du dénominateur des équations 2.24.

2.5.2.3. Diagramme d'émission dans les milieux 1 et 5

Afin d'avoir accès aux diagrammes d'émission dans les milieux 1 et 5 on calcule enfin la puissance émise par unité d'angle solide et de surface : $\Pi = dP/(d\Omega dS)$.

Pour cela, il est nécessaire de prendre en compte la modification d'angle solide d'émission du fait de la réfraction des faisceaux entre des milieux de différents indices de réfraction.

Benisty et al. (Benisty 1998 a) donne ainsi la relation suivante afin de calculer le diagramme d'émission dans les milieux 1 et 5 d'un dipôle situé à l'intérieur de la cavité :

$$\Pi_j = |E_j|^2 \frac{n_j k_{z,j}^2}{n_1 k_{z,1}^2} \quad \text{Eq. 2.33.}$$

Où l'indice j ($= 1$ ou 5) désigne le milieu considéré et E_j le champ émis dans le milieu j calculé à partir des équations 2.24.

2.5.2.4. Premières simulations et limitations du modèle

Validation du code de calcul

Dans un premier temps, nous avons cherché à valider les codes de calcul que nous avons écrits à partir du modèle décrit par Benisty et al. (Benisty 1998 a) et présentés ci-dessus. Pour cela, nous avons reproduit quelques une des simulations réalisées par Benisty et al.

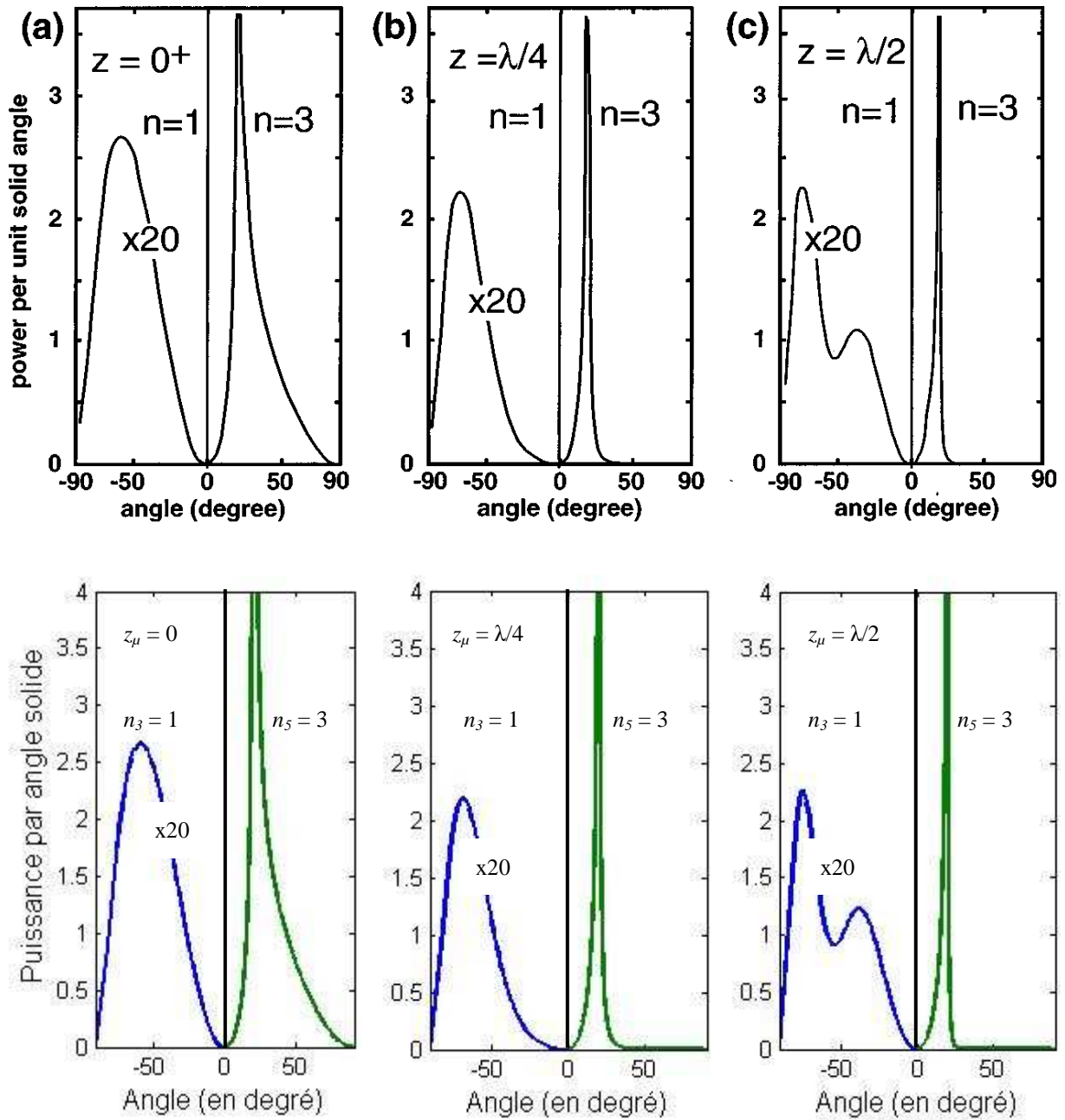


Figure 2.29. Diagramme d'émission d'un dipôle vertical situé dans le vide ($n_3 = 1$) et à une altitude de (a) $z_\mu = 0$, (b) $z_\mu = \lambda/4$ et (c) $z_\mu = \lambda/2$ au dessus d'un milieu massif d'indice de réfraction $n_5 = 3$. En noir sont représentés les diagrammes d'émission calculés par Benisty et al. (figure 4 de la publication Benisty 1998 a) et en couleur sont représentés les résultats obtenus par nos codes de calculs.

La bonne correspondance entre nos calculs et ceux réalisés par Benisty et al. nous permet donc de valider nos codes de calcul et de pouvoir à présent les utiliser pour simuler l'émission de dipôle situé dans des structures de notre choix.

Premières simulations

Simulons, à présent, les diagrammes d'émission d'un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope dans les deux configurations suivantes :

- à l'intérieur d'une cavité Fabry Péroit constituée d'un miroir métallique et d'un miroir réalisé par un

empilement de couches minces diélectriques (3,5 paires de couches de haut et bas indice de réfraction) (voir Figure 2.30 (a))

- à l'interface d'une lame de verre recouverte par une couche mince de fort indice de réfraction (voir Figure 2.30 (b)).

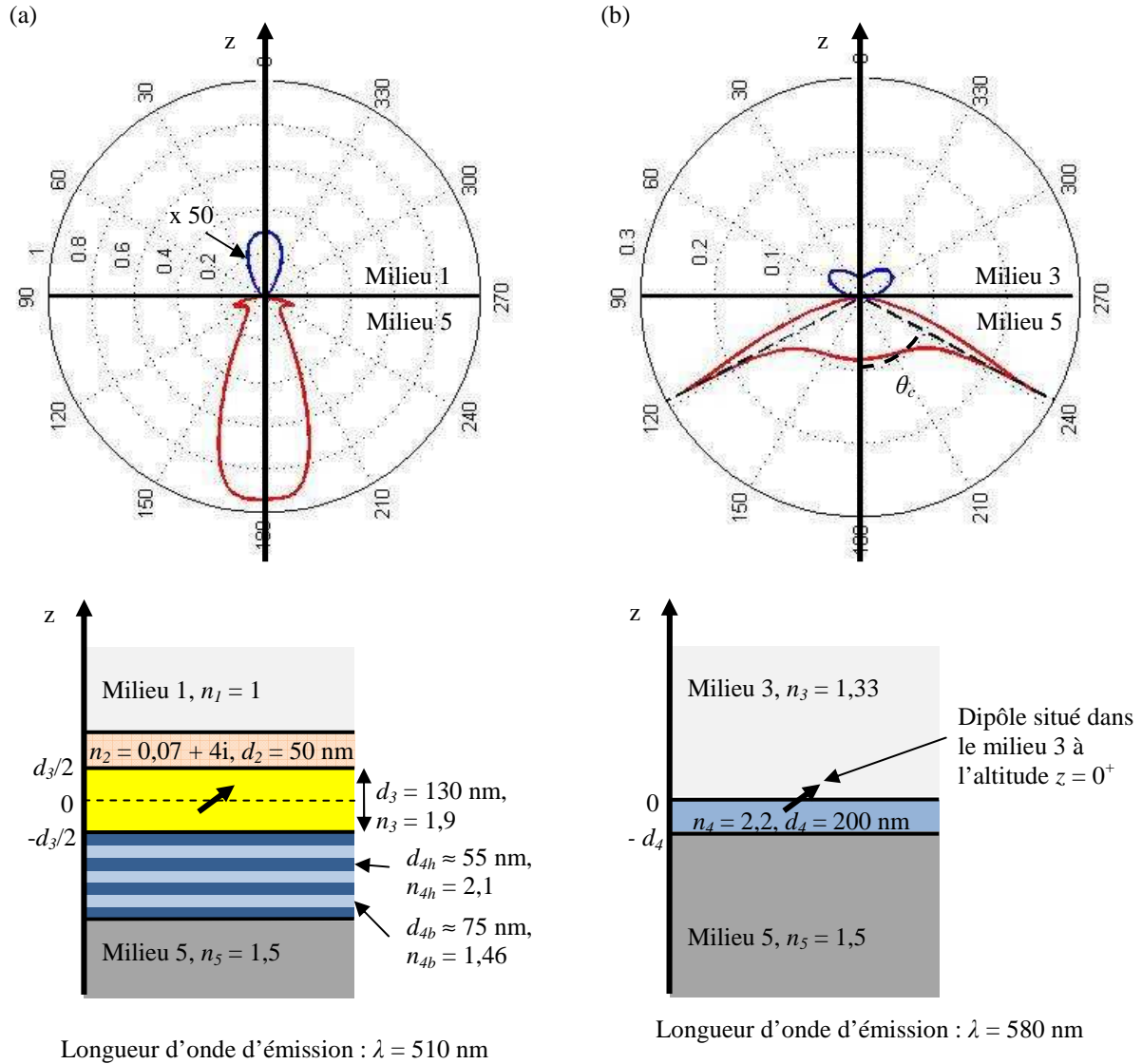


Figure 2.30. Diagramme d'émission en coordonnées polaires d'un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope et schéma de la structure simulée. (a) : Dans le cas d'un dipôle situé au milieu d'une cavité Fabry Péroth réalisée par un miroir en argent (milieu 2) et un miroir diélectrique (milieu 4) constitué de 3,5 paires de couches de haut (h) et bas (b) indice de réfraction. (b) : Dans le cas d'un dipôle situé dans de l'eau (milieu 3) au-dessus d'une lame de verre (milieu 5) et à l'altitude $z = 0^+$ (θ_c représente l'angle limite de réflexion totale entre les milieux 5 et 3).

Ces deux simulations nous permettent d'illustrer que selon son environnement, les propriétés spatiales d'émission d'un dipôle peuvent fortement changer. Une cavité Fabry Péroth a ainsi pour effet de resserrer l'émission du dipôle dans une ou plusieurs directions données (sur la Figure 2.30 (a)) dans la direction normale à la cavité). Une lame de verre a, quant à elle, pour effet de piéger une partie de l'énergie émise par le dipôle par réflexion totale. En effet, on voit sur la Figure 2.30 (b) qu'une part importante de l'énergie dissipée par le dipôle

est émise dans la lame de verre (milieu 5) avec un angle d'émission supérieur à l'angle limite de réflexion totale. Cette énergie reste donc piégée dans la lame. C'est sur ce principe que fonctionne l'instrument développé au laboratoire.

Limitations du modèle

Le modèle développé dans ce paragraphe permet donc de calculer la répartition spatiale de l'énergie émise par un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité asymétrique et ce dans les milieux extérieurs à la cavité.

Il est par ailleurs possible, par ce même formalisme, de calculer l'émission du dipôle dans n'importe quelle couche constituant la cavité. Il suffit pour cela de calculer les flux d'énergie propagatifs Π_{\uparrow} et contrapropagatifs Π_{\downarrow} dans la couche et de les sommer en utilisant séparément les champs propagatifs et contrapropagatifs pour les calculer.

Cependant, ce formalisme ne permet pas de décrire entièrement les différentes voies de relaxation du dipôle, en particulier les modes guidés. En effet, les directions de propagation parallèlement à l'interface ne sont pas prises en compte dans ce modèle or ce sont dans ces directions que les modes guidés se propagent. Les modes guidés étant des pôles des équations 2.20, la divergence de ces fonctions au niveau des modes guidés empêche donc tout calcul d'énergie couplée dans ces modes. Pour exemple, les diagrammes d'émission représentés sur la Figure 2.30 ne permettent pas de savoir si une part de l'énergie du dipôle reste piégée à l'intérieur de la cavité Fabry Pérot ou bien se retrouve couplée dans les modes guidés de la couche mince déposée à la surface de la lame de verre.

Cette dernière information est importante dans notre cas puisque l'on désire étudier l'effet d'une couche mince de fort indice de réfraction sur la collecte du signal de fluorescence et de son confinement dans une lame de verre. De plus, plusieurs équipes dont la notre (Labeye 2002 Gachet 2004, Seiler 2006) utilisent ou ont utilisé des guides d'onde afin d'acheminer les signaux des différents plots biologiques d'une puce vers un détecteur résolu spatialement (voir § 1.8.4). Nous avons donc besoin de pouvoir estimer la quantité d'énergie couplée dans de telles structures afin de pouvoir étudier notre système et en comparer les performances vis-à-vis d'instruments similaires.

Benisty et al. (Benisty 1998 a) propose une solution afin d'avoir accès à l'énergie couplée dans les modes guidés. Elle consiste à ajouter une couche absorbante ou bien de fort indice de réfraction à la structure afin d'absorber ou de découpler en modes radiatifs l'énergie couplée dans les modes guidés. Cependant, cette méthode ne nous a pas paru pertinente car l'ajout d'une couche supplémentaire entraîne une modification de la structure entourant le dipôle et donc de l'émission du dipôle. Par ailleurs, un formalisme différent décrit par Ford et Weber (Ford 1984) puis Barnes et al. (Barnes 1998) nous a permis d'avoir accès à une estimation de cette énergie d'une façon plus simple et directe. Etant donné, comme nous le verrons par la suite, que seule une très faible quantité de signal peut se coupler dans les modes guidés, nous n'avons pas cherché à développer le modèle de Benisty et al. plus en avant.

De la même manière, les dissipations non radiatives ne sont pas non plus prises en compte par la méthode décrite par l'équipe de Benisty. Or, plusieurs travaux ont montré que la présence d'un milieu absorbant à proximité d'un dipôle pouvait annihiler son émission radiative (Drexhage 1974, Ford 1984, Barnes 1998). La connaissance de ces pertes d'énergie radiative est donc importante que ce soit pour étudier l'émission des

OLEDs (effet des électrodes métalliques) ou bien la collecte de la fluorescence dans un guide d'onde réalisé sur un support absorbant tel que le Silicium. En effet, plusieurs biocapteurs utilisent des guides d'onde réalisés sur des substrats absorbant (Seiler 2006) ou transparent (Gachet 2004) afin d'adresser à chaque plot biologique un détecteur rendant le support multiplexe malgré une excitation globale du composant. Il est donc nécessaire de connaître les différentes voies de relaxation possibles de l'énergie des dipôles afin de pouvoir comparer les performances de ces systèmes à celles du prototype développé au laboratoire. L'objectif initial de ce travail n'était pas de classer deux méthodes de collection de la fluorescence mais de choisir celle la mieux adaptée à la problématique du projet. Ce choix conditionnait des orientations importantes pour ma thèse car les technologies de fabrication sont complètement différentes, la compatibilité de guides déposés sur silicium avec l'intégration d'OLED n'était pas évidente et le greffage de bio-récepteurs sur des verres dopés (guides réalisés par échanges d'ions) n'était pas maîtrisé au laboratoire. Une certaine logique poussait à poursuivre le travail de recherche démarré par A.L. Seiler mais nous avons souhaité vérifier que le bilan énergétique, donnant directement accès au rapport signal spécifique sur bruit, était favorable à de tels composants bien plus complexes que ceux développés au laboratoire (lame simple comme guide).

Nous avons donc choisi de développer un modèle basé sur une résolution directe des équations de Maxwell permettant de différencier les voies de relaxations radiatives ou non du dipôle et d'en évaluer les importances relatives. Ce modèle se base sur le calcul de la puissance totale émise par le dipôle suivant son environnement.

2.5.3. Spectre de puissance émise par un dipôle

2.5.3.1. Mise en place du modèle

Le but de ce paragraphe est de calculer la puissance totale émise P_T par un dipôle en fonction des propriétés de la cavité asymétrique dans laquelle il est situé. Dans le cas de milieu non absorbants et ne supportant pas de modes guidés, cette puissance totale est égale au flux du vecteur de Poynting à travers une sphère centrée sur le dipôle ce qui peut être calculé à partir des équations précédentes. Par contre, dans le cas de milieux absorbants (comme des milieux métalliques), P_T ne se résume plus à l'intégrale du flux du vecteur de Poynting. Une partie de P_T est non radiative : il est donc nécessaire de développer un modèle prenant en compte ces pertes non radiatives.

Par ailleurs, le calcul de P_T est étroitement lié à la mesure du temps de vie τ de l'émission du dipôle. En effet, P_T est proportionnel à l'inverse du temps de vie τ : $P_T \propto 1/\tau$. Plusieurs théories conduisant au calcul de P_T pour un dipôle à l'interface d'un matériau massif ont été élaborées et confrontées à la mesure de τ . Drexhage (Drexhage 1974), Lukosz (Lukosz 1977, Lukosz 1979) Ford et Weber (Ford 1984), Chance et al. (Chance 1978) ou encore Barnes (Barnes 1998) étudièrent théoriquement et expérimentalement l'influence de l'altitude et de l'orientation du fluorophore par rapport à l'interface avec le milieu massif sur P_T (et donc τ). Ces études permirent par exemple de mettre en évidence l'importance des pertes par effet non radiatif lorsqu'un dipôle se situe à de faibles distances d'un substrat métallique (Drexhage 1974).

Nous allons reprendre ici ces travaux, en particulier ceux de Ford et Weber (Ford 1984), et les étendre au cas d'un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité asymétrique.

Tout d'abord, l'équation donnant l'énergie totale dissipée par un dipôle μ_e situé en $\mathbf{r} = z_\mu \mathbf{e}_z$ est (Ford 1984) :

$$P_T = \frac{\omega}{2} \Im(\boldsymbol{\mu}_e^* \cdot \mathbf{E}) \quad \text{Eq. 2.34.}$$

où ω est la pulsation d'émission du dipôle, \mathbf{E} est le champ électrique au niveau du dipôle produit par le dipôle lui-même, \Im désigne la partie imaginaire de l'expression entre parenthèse et $*$ le complexe conjugué.

Dans le cas d'un dipôle à l'interface d'un milieu massif recouvert ou non par un empilement de couches minces (milieu 1, 2 et 3 confondus), le champ au niveau du dipôle est la somme du champ émis par le dipôle avec celui réfléchi par l'interface avec le substrat. A partir d'une décomposition en ondes planes de l'émission du dipôle et du calcul des coefficients de réflexion de Fresnel, Ford et Weber (Ford 1984) arrivent, dans ce cas, à la formule suivante de la puissance totale émise par le dipôle :

$$P_T = \frac{ck_3^4}{2\epsilon_3^{3/2}} \Re \int_0^\infty du \frac{u}{\sqrt{1-u^2}} \left\{ \begin{array}{l} \mu_\perp^2 u^2 [1 + r_{35}^p e^{+2ik_{z3}z_3}] \\ \frac{1}{2} \mu_{//}^2 [1 + r_{35}^s e^{+2ik_{z3}z_3}] \\ \frac{1}{2} \mu_{//}^2 (1-u^2) [1 - r_{35}^p e^{+2ik_{z3}z_3}] \end{array} \right\} \quad \text{Eq. 2.35.}$$

où u , la variable d'intégration, est la composante radiale du vecteur d'onde normalisé ($u = k_r/k_3$), $r_{35}^{s,p}$ sont les coefficients de réflexion entre les milieux 3 et 5 pour des ondes polarisées s ou p , et $\mu_\perp = |\mathbf{e}_z \cdot \boldsymbol{\mu}_e|$ et $\mu_{//} = |\boldsymbol{\mu}_e - (\mathbf{e}_z \cdot \boldsymbol{\mu}_e) \mathbf{e}_z|$ sont les composantes normales et radiales du dipôle d'émission. On rappelle que l'origine de l'axe Oz est au niveau du plan du dipôle et est orienté du milieu 5 vers le milieu 1 (voir Figure 2.24). Etant donné que l'on cherche à simuler les propriétés d'émission d'un dipôle situé dans une cavité asymétrique, nous allons à présent développer cette formule mise au point par Ford et Weber à ce cas plus général.

Dans le cas d'un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité fermée, le champ au niveau du dipôle est la somme des réflexions successives du champ \mathbf{E}_{dip} émis par le dipôle sur les miroirs composant la cavité (voir Figure 2.31).

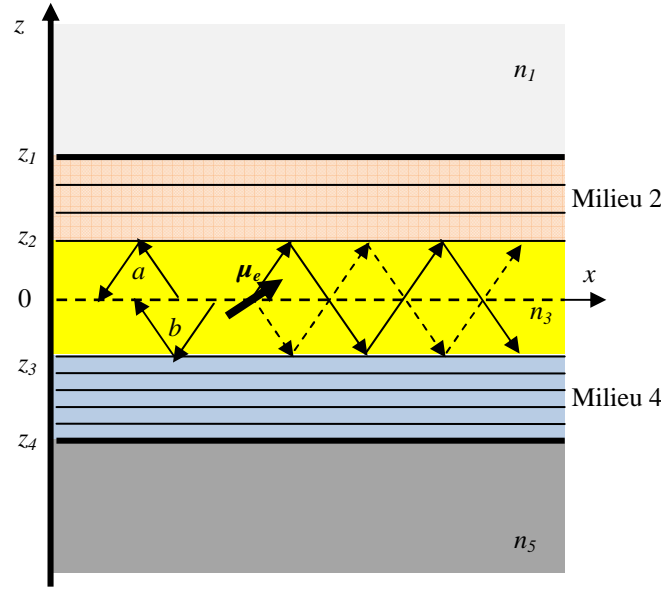


Figure 2.31. Représentation des réflexions successives du champ émis par le dipôle sur les miroirs de la cavité. Le champ total au niveau du dipôle est alors la somme de ces champs réfléchis.

Le champ en $z = 0$ issu des réflexions représentées par les flèches pleines sur la Figure 2.31 est alors égal à la somme :

$$\mathbf{E}_{\text{pleine}}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_{\text{dip}}(\mathbf{r}) (1 + a + ab + a^2b + a^2b^2 + a^3b^2 + a^3b^3 + \dots) \quad \text{Eq. 2.36.}$$

où a représente les variations d'amplitude et de phase du champ dues au trajet aller-retour entre l'altitude $z = 0$ et sa réflexion sur le milieu 2 et b les variations dues au trajet aller-retour entre l'altitude $z = 0$ et la réflexion sur le milieu 4.

De même, le champ en $z = 0$ issu des réflexions représentées par les flèches pointillées sur la Figure 2.31 est égal à la somme :

$$\mathbf{E}_{\text{pointillée}}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_{\text{dip}}(\mathbf{r}) (1 + b + ab + ab^2 + a^2b^2 + a^2b^3 + a^3b^3 + \dots) \quad \text{Eq. 2.37.}$$

Selon la polarisation de l'onde, les coefficients a et b sont :

- pour les composantes perpendiculaires des ondes polarisées p : $a_{\perp}^p = r_{31}^p e^{-2ik_{z3}z_2}$ et $b_{\perp}^p = r_{35}^p e^{2ik_{z3}z_3}$
- pour les composantes parallèles des ondes polarisées p : $a_{\parallel}^p = -r_{31}^p e^{-2ik_{z3}z_2}$ et $b_{\parallel}^p = -r_{35}^p e^{2ik_{z3}z_3}$
- pour les composantes parallèles des ondes polarisées s : $a_{\parallel}^s = r_{31}^s e^{-2ik_{z3}z_2}$ et $b_{\parallel}^s = r_{35}^s e^{2ik_{z3}z_3}$

Le champ total au niveau du dipôle (en $z = 0$) est donc, pour chaque polarisation s ou p du champ, la somme de $\mathbf{E}_{\text{pleine}}$ et $\mathbf{E}_{\text{pointillé}}$.

En reprenant l'équation 2.24 afin de prendre en compte de ces multiples réflexions, on obtient alors une expression donnant la puissance totale émise par un dipôle dans une cavité asymétrique :

$$P_T = \frac{ck_3^4}{2\epsilon_3^{3/2}} \Re \int_0^\infty du \frac{u}{\sqrt{1-u^2}} \left\{ \begin{aligned} &\mu_\perp^2 u^2 \left[\frac{(1+r_{31}^p e^{-2ik_{z3}z_2})(1+r_{35}^p e^{+2ik_{z3}z_3})}{1-r_{31}^p r_{35}^p e^{2ik_{z3}d_3}} \right] \\ &\frac{1}{2} \mu_\parallel^2 \left[\frac{(1+r_{31}^s e^{-2ik_{z3}z_2})(1+r_{35}^s e^{+2ik_{z3}z_3})}{1-r_{31}^s r_{35}^s e^{2ik_{z3}d_3}} \right] \\ &\frac{1}{2} \mu_\parallel^2 (1-u^2) \left[\frac{(1-r_{31}^p e^{-2ik_{z3}z_2})(1-r_{35}^p e^{+2ik_{z3}z_3})}{1-r_{31}^s r_{35}^s e^{2ik_{z3}d_3}} \right] \end{aligned} \right\} \quad \text{Eq. 2.38.}$$

où u , la variable d'intégration, est la composante radiale du vecteur d'onde normalisé ($u = k_r/k_3$), $r_{31}^{s,p}$ et $r_{35}^{s,p}$ sont les coefficients de réflexion entre les milieux 3 et 1 et les milieux 3 et 5 pour des ondes polarisées s ou p , et $\mu_\perp = |\mathbf{e}_z \cdot \boldsymbol{\mu}_e|$ et $\mu_\parallel = |\boldsymbol{\mu}_e - (\mathbf{e}_z \cdot \boldsymbol{\mu}_e) \mathbf{e}_z|$ sont les composantes normale et radiale du dipôle d'émission.

On remarque que l'on retrouve l'équation 2.24 représentant la puissance totale émise par un dipôle situé à l'interface d'un milieu massif car dans ce cas, les coefficients r_{31}^s et r_{31}^p sont nuls.

A ce stade, nous pouvons introduire la quantité dP/du , spectre de puissance dans l'espace des vecteurs d'onde radiaux normalisés. L'équation 2.27 s'écrit alors sous la forme :

$$P_T = \int_0^\infty \frac{dP}{du} du \quad \text{Eq. 2.39.}$$

L'étude de ce spectre de puissance en fonction de u va alors permettre de définir les différents domaines de relaxation du dipôle en fonction des propriétés de la structure dans laquelle il est situé et d'en étudier les importances relatives. En effet, la valeur de la variable d'intégration u va déterminer dans quels types de modes l'énergie du dipôle sera dissipée (modes radiatifs, modes guidés ou modes non radiatifs). En intégrant la fonction $dP/du(u)$ sur ces différents domaines, nous serons alors en mesure de comparer les puissances émises dans chacun des modes de relaxation possibles.

2.5.3.2. Premières simulations

Validation du code de calcul

Nous avons à nouveau cherché dans un premier temps à valider nos codes de calculs à partir des résultats présentés dans la littérature. Pour cela nous avons reproduit certaines simulations effectuées par Ford et Weber (Ford 1984) et Barnes et al. (Barnes 1998). Etant donné que nous avons réussi à reproduire leurs résultats dans le cas de dipôles à l'interface d'un milieu massif éventuellement recouvert par une couche mince, nous avons considéré que la transposition en codes de calculs n'introduisait pas d'erreur.

Premières simulations

Reprenons les deux structures décrites sur la Figure 2.30. Le calcul du spectre de puissance émise par un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope dans ces deux configurations donne :

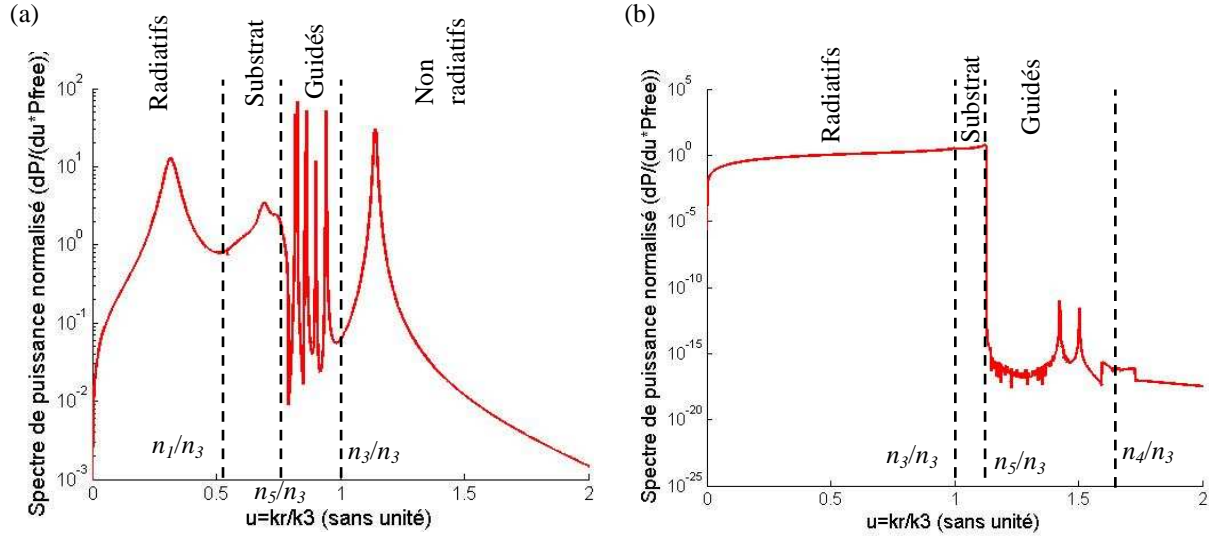


Figure 2.32. Spectre de puissance dP/du normalisé par la puissance émise par un dipôle dans un milieu infini d'indice réfraction n_3 pour un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope et situé (a) à l'intérieur d'une cavité Fabry Pérot (décrite sur la Figure 2.30 (a)) et (b) à l'interface d'une lame de verre recouverte par une couche mince de fort indice de réfraction (configuration décrite sur la Figure 2.30 (b)). P_{free} représente la puissance totale émise par un dipôle dans un milieu infini d'indice de réfraction n_3 calculé par la formule de Larmor (Ford 1984).

Nous voyons qu'il est possible de séparer l'émission du dipôle en plusieurs domaines suivant la valeur de la variable u :

- i. les modes radiatifs. Ce sont les modes pouvant se propager dans l'ensemble des milieux transparents de la cavité et dont on calcule la répartition spatiale d'énergie par le modèle présenté précédemment. Il s'agit du domaine $0 < u < n_1/n_3$ sur la Figure 2.32 (a) et du domaine $0 < u < n_3/n_3$ sur la Figure 2.32 (b),
- ii. les modes de substrat. Ce sont les modes radiatifs dans le substrat (milieu 5) et évanescents dans le superstrat (milieu 1 dans le cas de la Figure 2.30 (a) ou 3 dans le cas de la Figure 2.30 (b)) dont l'indice de réfraction est plus faible. Ces modes sont donc émis avec un angle supérieur à l'angle limite de réflexion totale entre ces deux milieux. Il s'agit du domaine $n_1/n_3 < u < n_5/n_3$ sur la Figure 2.32 (a) et du domaine $n_3/n_3 < u < n_5/n_3$ sur la Figure 2.32 (b). C'est l'énergie lumineuse transportée dans ces modes que l'on détecte dans l'instrument développé au laboratoire,
- iii. les modes guidés. Ils correspondent à l'énergie lumineuse piégée dans la cavité ou dans une des couches transparentes de fort indice de réfraction qui la constitue. Les modes guidés sont des pôles de la fonction $dP/du(u)$ et sont donc représentés par des pics dans le domaine $n_5/n_3 < u < n_3/n_3$ sur la Figure 2.32 (a) et le domaine $n_5/n_3 < u < n_4/n_3$ sur la Figure 2.32 (b),
- iv. les modes non radiatifs. Ils correspondent aux dissipations d'énergie dans les milieux absorbants : par exemple dans le cas de la Figure 2.32 (a), l'énergie qui est couplée dans les modes de plasmons de surface de la couche métallique et représentée par le pic pour $u \approx 1,14$. Ces dissipations non radiatives sont des pertes d'énergie lumineuse.

Pour résumer, nous avons représenté ces quatre domaines de relaxations possibles de l'énergie du dipôle dans une cavité asymétrique sur la figure suivante :

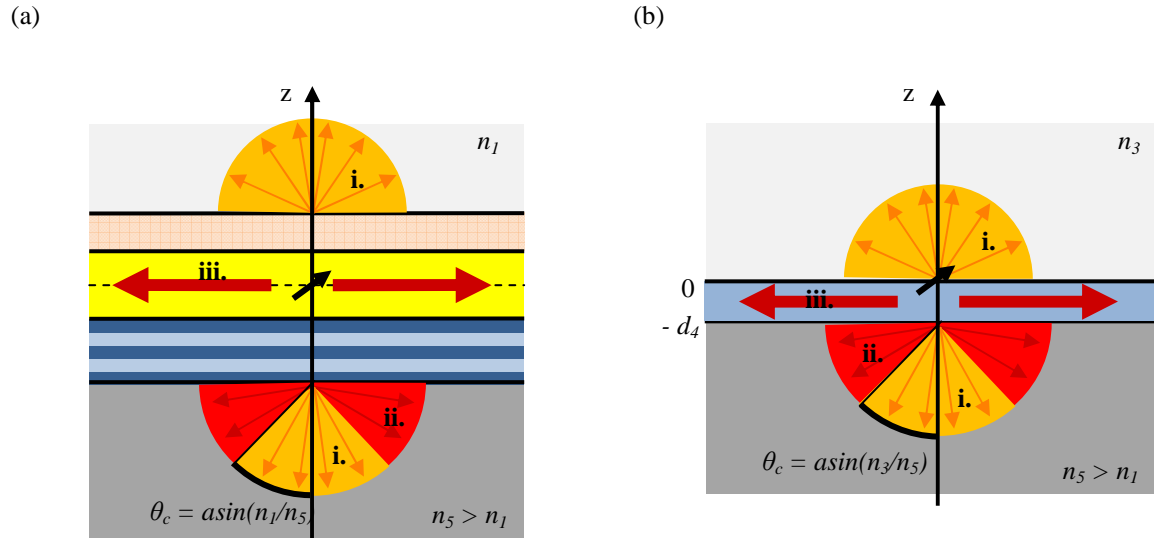


Figure 2.33. Représentation schématisée des différentes voies de dissipation de l'énergie d'un dipôle situé à l'intérieur d'une cavité asymétrique. (a) : dans le cas d'une cavité Fabry Péroth représentée sur la Figure 2.30 (a). (b) : dans le cas d'un dipôle à l'interface d'une lame de verre recouverte par une couche mince de fort indice de réfraction (cas de la Figure 2.30 (b)). Le domaine i correspond aux modes radiatifs, le domaine ii aux modes de substrat et le domaine iii aux modes guidés. Les dissipations non radiatives n'ont pas été représentées sur ce schéma.

L'émission dans le substrat (milieu 5), d'indice de réfraction plus élevé que le superstrat (milieu 1 ou 3), est composée de deux types de modes, les modes radiatifs et les modes de substrats, qui sont émis pour des angles d'émission respectivement inférieures et supérieures à l'angle limite de réflexion totale θ_c . Afin de distinguer ces deux zones d'émission dans le substrat, nous utiliserons les termes émission "sous-critique" et "sur-critique" qui correspondent respectivement à ces deux types de modes émis dans le substrat.

2.5.3.3. Collecte de la fluorescence dans le substrat

Nous pouvons à présent, grâce à ce modèle, effectuer une comparaison des performances de notre instrument avec celles d'instruments similaires utilisant le même principe de collection de la fluorescence comme les systèmes utilisés par Gachet et Seiler présentés au paragraphe 1.8.4. En effet, il nous est maintenant possible de comparer l'efficacité de collection de la fluorescence des différentes architectures de ces instruments.

Les architectures de ces trois systèmes sont représentées sur la figure suivante :

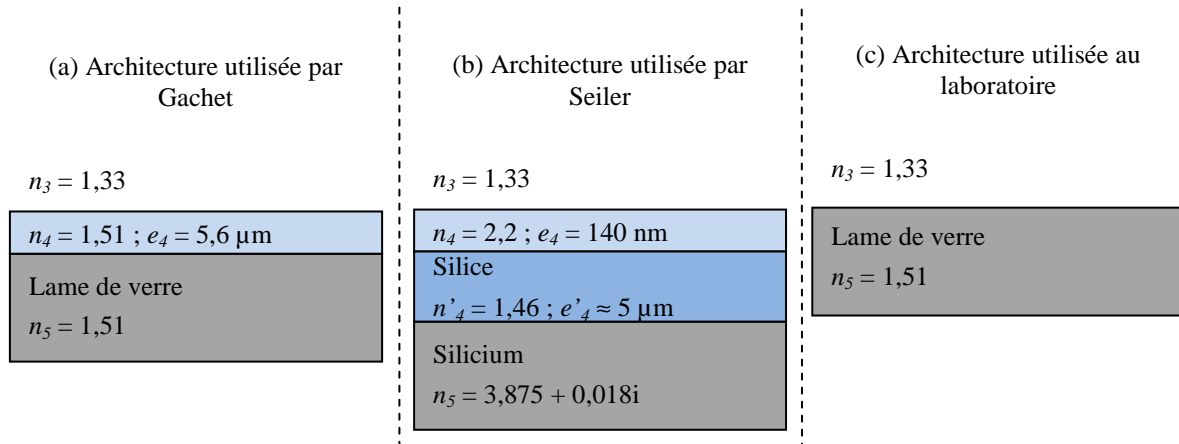


Figure 2.34. Schéma des architectures utilisées par (a) Gachet (Gachet 2004), par (b) Seiler (Seiler 2006) et par (c) le système développé au laboratoire.

Afin de comparer ces trois architectures en termes de collecte du signal de fluorescence, nous calculons le spectre de puissance d'un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope, situés à une altitude $z_u = 10 \text{ nm}$ au dessus de ces trois composants et émettant à 580 nm (longueur d'onde d'émission du fluorophore Cy3).

Pour l'architecture utilisée par Gachet (voir Figure 2.34 (a))

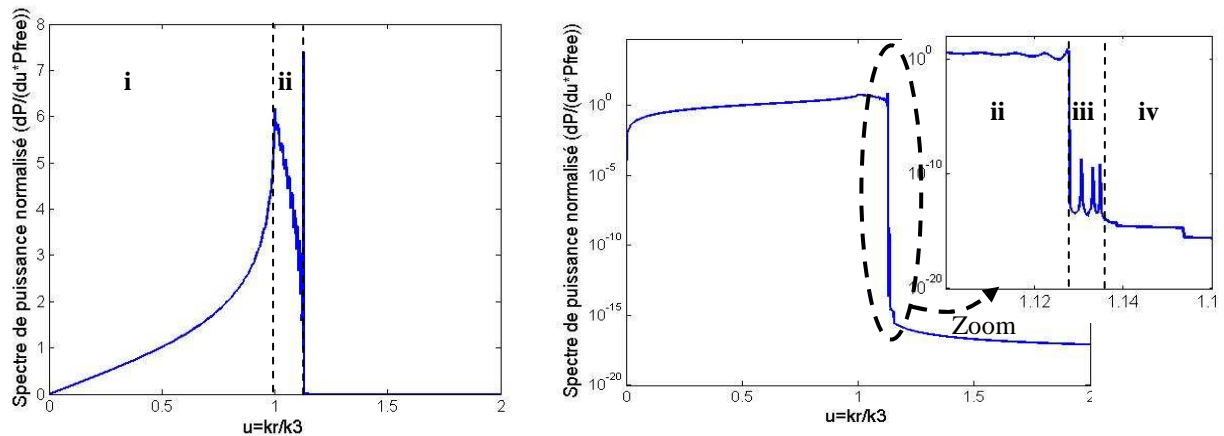


Figure 2.35. Spectre normalisé de puissance pour un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope à une altitude $z_u = 10 \text{ nm}$ du composant utilisé par Gachet en échelle linéaire (à gauche) et semi-logarithmique (à droite). Les domaines **i**, **ii**, **iii**, et **iv** font référence aux domaines définis au paragraphe 2.5.3.2 et correspondent respectivement aux modes radiatifs, aux modes sur-critiques, aux modes guidés et aux dissipations non radiatives.

On observe donc que le dipôle peut coupler une partie de son énergie dans trois modes guidés TE et TM différents.

En intégrant ce spectre de puissance suivant les différents domaines **i**, **ii**, **iii**, et **iv**, il est possible de calculer les importances relatives des différents modes de relaxation des dipôles situés à l'interface de ce composant. On trouve ainsi que :

	Puissance couplée (en u.a.)	Fraction de la puissance émise par les dipôles (en %)
Les modes radiatifs	$1,29.10^4$	70,3
Les modes sur-critiques	$5,45.10^3$	29,7
Les modes guidés	$2,86.10^{-9}$	$1,5.10^{-11}$

Table 2.3 Fraction de la puissance émise par les dipôles situés à l'interface du composant utilisé par Gachet dans les différents domaines d'émission possibles des dipôles. Cette fraction est calculée par rapport à la puissance totale émise par ces dipôles.

On observe donc que très peu d'énergie émise par les dipôles est couplée dans les modes guidés. La détection de ce signal impose donc, pour atteindre les limites de détection nécessaire à notre application, l'utilisation d'un détecteur très sensible et/ou un temps d'intégration relativement long.

Par ailleurs, on remarque que 30 % de l'émission des dipôles est couplée dans la lame de verre.

Or, le système de mesure utilisé par Gachet repose sur l'excitation simultanée de l'ensemble des plots biologiques de la puce. Le signal de fluorescence de chacun des plots est ensuite collecté par un guide d'onde et est guidé vers un détecteur résolu spatialement (par exemple une barrette de détecteurs)

A l'intérieur du substrat va donc se retrouver mêlée 30 % de l'émission de chacun des plots biologiques de la puce. Ce signal, qui devient non spécifique d'un plot en particulier, crée un signal de fond très important vis-à-vis du signal guidé dans chacun des guides d'onde. On observe alors une perte de contraste entre le signal des modes guidés, spécifique d'un plot biologique, et le signal de fond (voir Figure 2.36). Cela explique les faibles performances obtenues par ce système.

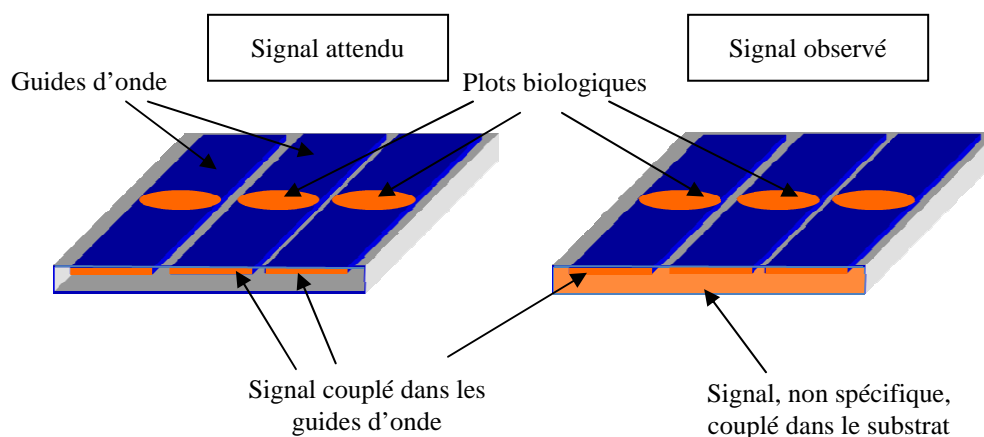


Figure 2.36. Schéma illustrant la perte prévisible de contraste en bout de lame entre la faible quantité de signal couplé dans les guides d'onde spécifique de chacun des plots biologiques de la puce et le signal de l'ensemble des plots couplé dans le substrat créant un signal de fond important.

Le problème principal de la méthode de mesure utilisée par Gachet est donc d'exciter l'ensemble des plots biologiques à la fois. Cela entraîne une perte de contraste limitant les performances de détection. Une solution pour éviter cette perte de contraste serait de n'exciter qu'un seul plot biologique à la fois. L'utilisation de guides d'ondes et d'un détecteur résolu spatialement ne serait alors plus pertinente et le système reviendrait à celui développé au laboratoire.

Pour l'architecture utilisée par Seiler (voir Figure 2.34 (b))

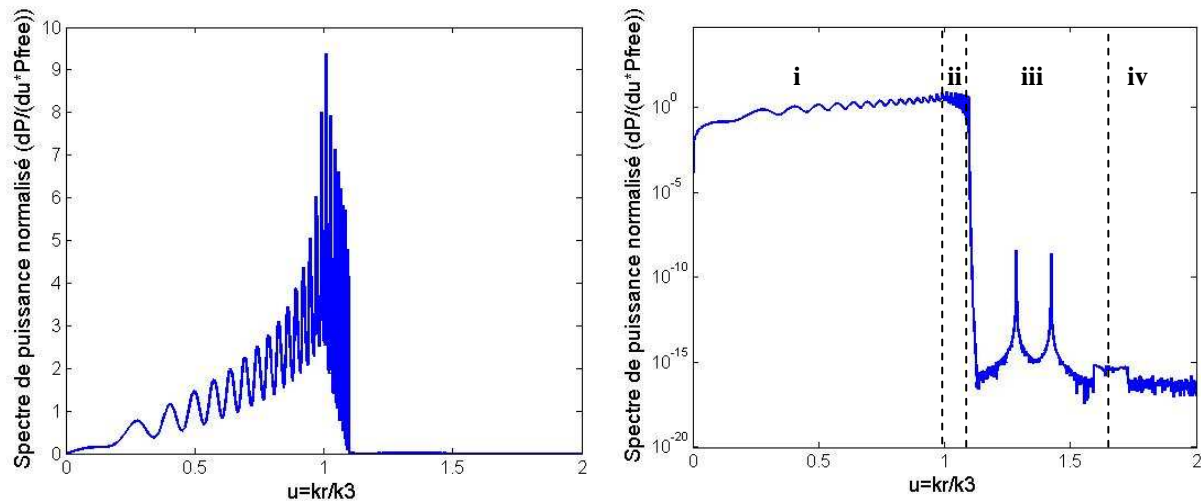


Figure 2.37. Spectre normalisé de puissance pour un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope à une altitude $z_u = 10$ nm du composant utilisé par Seiler en échelle linéaire (à gauche) et semi-logarithmique (à droite). Les domaines i, ii, iii, et iv font référence aux domaines définis au paragraphe 2.5.3.2 et correspondent respectivement aux modes radiatifs, aux modes sur-critiques, aux modes guidés et aux dissipations non radiatives.

On observe cette fois la présence de deux modes guidés et on calcule que :

	Puissance couplée (en u.a.)	Fraction de la puissance émise par les dipôles (en %)
Les modes radiatifs	$1,24 \cdot 10^4$	87,2
Les modes sur-critiques	$1,82 \cdot 10^3$	12,8
Les modes guidés	$1,01 \cdot 10^{-8}$	$7,13 \cdot 10^{-11}$

Table 2.4 Fraction de la puissance émise par les dipôles situés à l'interface du composant utilisé par Seiler dans les différents domaines d'émission possibles des dipôles. Cette fraction est calculée par rapport à la puissance totale émise par ces dipôles.

On observe à nouveau que très peu de signal de fluorescence est couplé dans les modes guidés et que 12 % de la fluorescence est couplée dans la couche de Silice.

Ce système utilisant aussi une excitation simultanée de l'ensemble des plots de la puce, un signal de fond important se crée donc dans la couche de Silice. Ce signal, s'il n'est pas atténué par les réflexions sur le substrat en Silicium lors de son guidage entraîne une perte de contraste en bout de composant (voir Figure 2.36).

Cependant, le coefficient de réflexion sur du Silicium pour des angles d'incidences importants est compris entre 70 et 90 %. Le signal guidé dans la couche de Silice est donc rapidement absorbé par le substrat, d'autant plus rapidement que la couche de silice est fine. Cela permet alors de s'affranchir du problème de perte de contraste limitant fortement le rapport signal sur bruit et seuls les signaux couplés dans les guides d'onde peuvent atteindre le détecteur. Mais ces signaux sont très faibles et il devient alors nécessaire d'utiliser des détecteurs très sensibles pour les mesures ce qui rend le système complexe (alignement d'une matrice de détecteur devant les sorties des guides, indexation des sorties sur les photo-sites) et finalement peu sensible si on considère l'énergie émise par les dipôles perdue dans le silicium.

Par ailleurs, afin de limiter au maximum les pertes de contrastes en bout de composant et de réduire au maximum le vignetage (différence de niveau mesuré selon la position du plot sur la puce), il faut utiliser des composants d'une taille suffisante pour que les réflexions successives sur le substrat atténuent fortement le signal de fond couplé dans la couche de Silice. Le coût de tels composants (quelques cm² de surface possédant des guides gravés) devient important voir prohibitifs pour des applications où le composant est jeté après chaque utilisation.

Remarque : Nous reviendrons et expliquerons la présence d'oscillations sur le spectre de puissance d'un dipôle situé à l'interface d'un milieu stratifié lors de l'étude des effets d'une couche de fort indice de réfraction à la surface d'une lame de verre pour l'instrument développé au laboratoire (voir § 3.3.4.2).

Pour l'architecture développée au laboratoire (voir Figure 2.34 (c))

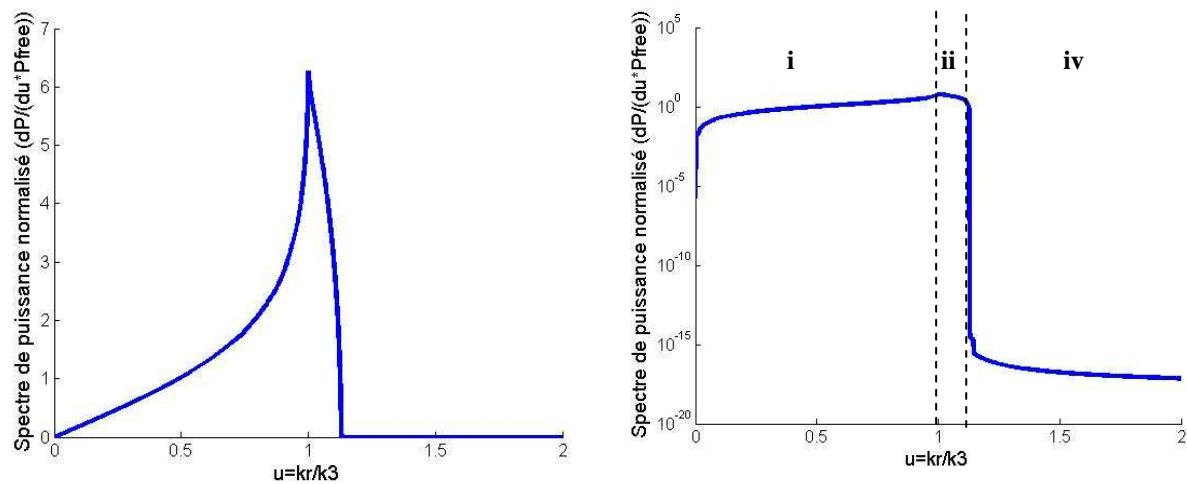


Figure 2.38. Spectre normalisé de puissance pour un ensemble de dipôle orientés de manière isotrope à une altitude $z_\mu = 10$ nm du composant développé au laboratoire en échelle linéaire (à gauche) et semi-logarithmique (à droite). Les domaines i, ii, iii, et iv font référence aux domaines définis au paragraphe 2.5.3.2 et correspondent respectivement aux modes radiatifs, aux modes sur-critiques, aux modes guidés et aux dissipations non radiatives.

On observe cette fois qu'il n'y a pas de modes guidés puisqu'il n'y a pas de structure (couche mince) pour les supporter et on calcule que :

	Puissance couplée (en u.a.)	Fraction de la puissance émise par les dipôles (en %)
Les modes radiatifs	$1,30.10^4$	70,87
Les modes sur-critiques	$5,33.10^3$	29,13
Les modes guidés		

Table 2.5 Fraction de la puissance émise par les dipôles situés à l'interface du composant développé au laboratoire dans les différents domaines d'émission possibles des dipôles. Cette fraction est calculée par rapport à la puissance totale émise par ces dipôles.

On remarque cette fois que 30 % de l'énergie des dipôles est émise dans le substrat mais sans possibilité de couplage dans des modes guidés. En effet, aucun milieu de la structure ne supporte des modes guidés.

Etant donné que le système développé au laboratoire excite tour à tour chacun des plots biologiques afin de dissocier leurs signaux, il n'y a donc pas de mélange de ces derniers dans le substrat et donc de pertes de contraste. De plus, beaucoup plus de signal spécifique est porté par l'ensemble des modes sur-critiques, est guidé en bout de lame, ce qui doit permettre de bien meilleures performances de détection que les systèmes de Gachet et Seiler où seule l'énergie couplée dans les modes guidés est spécifique. C'est d'ailleurs ce que démontrent les expériences réalisées en laboratoire qui donnent des limites de détection équivalentes à celle des meilleurs scanners commerciaux de biopuce disponibles actuellement.

Conclusions

L'analyse théorique de ces différentes architectures nous permet donc de conclure que le système le plus performant est celui développé au laboratoire car l'excitation tour à tour de chacun des plots biologiques permet :

- de détecter l'ensemble de la fluorescence couplée dans les modes sur-critiques et non uniquement dans les modes guidés. Plus de signal spécifique parvient donc au détecteur,
- d'éviter la perte de contraste du fait du mélange des signaux des différents plots biologiques créant un signal de fond important dans le substrat,
- d'utiliser une puce plus simple ne possédant pas des structures de guides d'onde nécessitant de nombreuses étapes technologiques pour leur réalisation,
- d'utiliser des composants optiques plus simples, en particulier un détecteur non résolu spatialement.

De plus, le système d'excitation des systèmes de Gachet et Seiler utilisent une seule source pour exciter l'ensemble des plots biologiques. La densité de puissance au niveau de la puce est donc plus faible que dans le cas où une source d'excitation est associée à chaque plot fluorescent comme pour l'instrument développé au laboratoire. Les performances de détection en sont alors limitées. Une solution pour augmenter cette densité de puissance d'excitation dans ces systèmes serait d'utiliser une matrice de sources d'excitation. L'emploi d'une matrice de source permet alors de n'exciter qu'un plot à la fois : les guides ne sont plus nécessaires pour discrétiser la mesure.

2.5.3.4. Limitation du modèle

Dans le paragraphe précédent, nous avons intégré numériquement le spectre de puissance dissipée dans les différents domaines possibles de relaxation de l'énergie des dipôles. Ce calcul est valable dans le cas des modes radiatifs et sur-critiques mais pose problème pour calculer l'énergie exacte émise dans les modes guidés. En effet, les modes guidés sont des pôles de la fonction $dP/du(u)$. L'intégration numérique permet donc de donner uniquement des valeurs approchées de la puissance couplée dans les modes guidés et dépend par exemple de l'échantillonnage utilisé pour calculer le spectre de puissance. Afin de confirmer les résultats présentés ci-dessus, nous avons choisi de développer un dernier modèle basé sur la théorie des modes couplés. Ce modèle consiste à calculer le recouvrement entre les modes évanescents du dipôle et le profil des modes guidés supportés par la structure. Nous avons préféré développer un tel formalisme que d'étendre le modèle présenté par Benisty et al. car ce dernier nous a semblé plus complexe et moins direct que la théorie des modes couplés classiquement utilisée pour décrire les interactions de la lumière avec un guide d'onde.

Ce modèle a été développé en collaboration avec A. Morand Maître de Conférence à l'Institut de

Microélectronique Electromagnétisme et Photonique de Grenoble.

2.5.4. Energie couplée dans les modes guidés

2.5.4.1. Mise en place du modèle

La théorie des modes couplés décrit le couplage d'une onde dans une structure lorsqu'il y a une perturbation du champ électromagnétique à proximité. Dans notre cas, la perturbation du champ électromagnétique est créée par le dipôle et est confinée à sa position.

Cette théorie repose sur le calcul du recouvrement entre le profil des modes guidés et celui des champs de la perturbation ici créée par l'émission du dipôle. Du fait de la symétrie cylindrique par rapport à l'axe (Oz) nous calculerons cette intégrale de recouvrement sur la surface S d'un cylindre d'axe (Oz) et dont on fera tendre le rayon ρ vers 0 pour ne prendre en compte que la contribution du dipôle situé en $\rho = 0$.

La formule donnant l'intégrale de recouvrement est la suivante :

$$\Gamma_{\text{mode } i} = \frac{\left| \iint_S \mathbf{E}_{\text{dip}} \wedge \mathbf{H}_{\text{mode } i} dS \right|^2}{\iint_S \mathbf{E}_{\text{dip}} \wedge \mathbf{H}_{\text{dip}} dS \times \iint_S \mathbf{E}_{\text{mode } i} \wedge \mathbf{H}_{\text{mode } i} dS} \quad \text{Eq. 2.40.}$$

où Γ représente le taux de coulage dans le mode guidé i , S la surface du cylindre centré sur l'axe (Oz) de rayon ρ et de hauteur infinie, \mathbf{E}_{dip} et \mathbf{H}_{dip} représentent les champs électriques et magnétiques émis par le dipôle et $\mathbf{E}_{\text{mode } i}$ et $\mathbf{H}_{\text{mode } i}$ sont les champs électrique et magnétique du $i^{\text{ème}}$ mode guidé dans le milieu 2.

Le numérateur de cette fonction représente le recouvrement entre les profils des modes guidés et les champs émis par le dipôle (voir Figure 2.39), alors que le dénominateur est le facteur de normalisation. Nous nous intéresserons par la suite essentiellement au numérateur, le premier terme du facteur de normalisation pouvant être obtenu en intégrant la fonction $dP/du(u)$ pour $u \in [0, +\infty]$ et le second étant égal à 1 (voir ci-dessous).

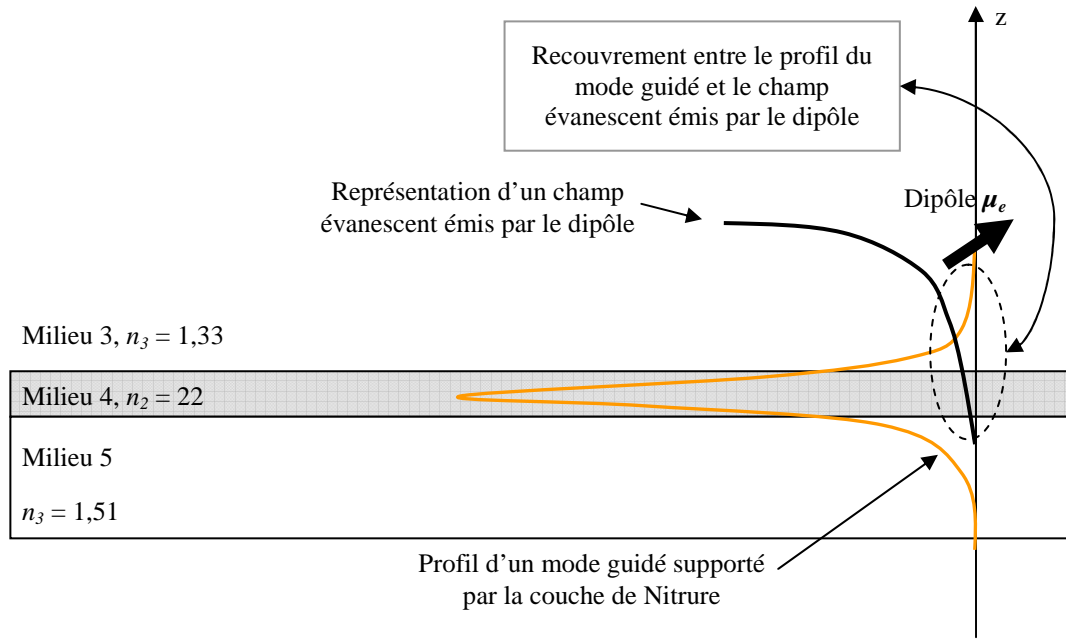


Figure 2.39. Représentation schématique du calcul du recouvrement entre les champs évanescents émis par un dipôle à l'interface d'une lame de verre recouvert par une couche mince de Nitrure, et le profil d'un mode guidé supporté par cette couche.

La représentation de la Figure 2.39 permet déjà de donner quelques explications sur le mécanisme de couplage de l'énergie du dipôle dans les modes guidés. Tout d'abord, seuls des modes évanescents du dipôle pourront être couplés dans les modes guidés supportés par la couche mince car leurs constantes de propagation doivent correspondre. Ce couplage aura alors une décroissance exponentielle avec l'altitude du dipôle du fait du caractère évanescent des modes pouvant être couplés. Ensuite, il sera fortement dépendant de la queue évanescente du profil des modes guidés présente dans le milieu où se trouve le dipôle (milieu 3). En effet, plus ces modes auront une queue évanescente importante dans le milieu 3 et plus le recouvrement, et donc le couplage, avec les modes du dipôle sera efficace. Afin de coupler un maximum d'énergie dans les modes guidés, il est donc nécessaire de bien dimensionner le guide d'onde afin de maximiser la queue évanescente du profil de modes guidés dans le milieu où se situe le dipôle.

Dans un souci de simplification, considérons que seule l'onde plane du dipôle ayant la composante radiale de son vecteur d'onde égale au vecteur d'onde d'un mode guidé pourra se coupler dans ce mode. En effet, si on considère les modes guidés comme parfaits, c'est-à-dire n'étant pas soumis à des perturbations dues, par exemple à l'émission du dipôle, ce mode guidé ne présentera pas de divergence autour de son vecteur d'onde. Ainsi pour un mode guidé d'indice effectif n_{eff} , seule l'onde plane du dipôle ayant la composante radiale de son vecteur d'onde égale à $k_0 n_{eff}$ pourra se coupler dans ce mode.

On peut alors simplifier l'expression de l'intégrale de recouvrement :

$$\Gamma_{mode i} = \frac{\left| \iint_S \xi_{dip}^{k_{ri}} \wedge \mathbf{H}_{mode i} dS \right|^2}{\iint_S \mathbf{E}_{dip} \wedge \mathbf{H}_{dip} dS \times \iint_S \mathbf{E}_{mode i} \wedge \mathbf{H}_{mode i} dS} \quad \text{Eq. 2.41.}$$

où k_{ri} représente la composante radiale du vecteur d'onde égale à $k_0 n_{eff,i}$ avec $n_{eff,i}$ l'indice effectif du mode guidé numéro i , et $\xi_{dip}^{k_{ri}}$ représente l'onde plane issue de la décomposition de l'émission du dipôle ayant sa composante radiale égal à k_{ri} .

Pour le calcul de ce recouvrement, il est donc nécessaire de connaître la décomposition en ondes planes, exprimées en coordonnées cylindriques, du champ émis par le dipôle, ainsi que les champs magnétiques et électriques des différents modes guidés supportés par le milieu 2 :

- pour le champ émis par le dipôle, nous utilisons la décomposition en ondes planes et les calculs effectués par Hellen (Hellen 1987) afin de déterminer l'expression des ondes planes émises par le dipôle à l'interface d'une lame de verre. On projette ensuite ces ondes planes sur la base $(\hat{s}, \hat{p}, \hat{z})$ associée à la direction d'observation (voir Figure 2.23),
- pour les modes guidés, nous calculons les profils U_{TE}^i, U_{TM}^i des n modes guidés TE et TM confinés dans le milieu 2 à partir de la résolution des équations de Maxwell pour un guide plan asymétrique. En effet, les dimensions nanométriques de ces guides nous obligent à considérer le caractère ondulatoire de la lumière afin de décrire la propagation de ces modes. Ce calcul a été réalisé en collaboration avec le Dr. A. Morand de l'IMEP (Grenoble) qui a fourni les profils normalisés des modes guidés de plusieurs configurations que nous avons testées.

Or les champs TE et TM dans un guide plan ont respectivement leurs composantes électrique et magnétique orientées parallèlement aux interfaces séparant les différents milieux. Dans notre base cylindrique, nous pouvons donc considérer que la composante électrique du mode TE et la composante magnétique du mode TM sont polarisées suivant \mathbf{e}_ρ dont la projection sur la base d'observation $(\hat{s}, \hat{p}, \hat{z})$ donne : $\mathbf{e}_\rho = \cos \theta \hat{p} + \sin \theta \hat{s}$.

De plus, les composantes électrique et magnétique des champs TE et TM doivent satisfaire l'équation de Helmholtz :

$$\Delta \varphi + k^2 \varphi = 0 \quad \text{Eq. 2.42.}$$

qui en coordonnées cylindriques peut s'exprimer sous la forme :

$$\rho^2 \frac{\partial^2 \varphi}{\partial \rho^2} + \rho \frac{\partial \varphi}{\partial \rho} + (k^2 \epsilon_r \rho^2 - m) \varphi = 0 \quad \text{Eq. 2.43.}$$

où φ désigne ici aussi bien la composante électrique du champ TE que la composante magnétique du champ TM.

Les solutions de cette équation sont la somme de deux ondes contra-propagatives représentées par les fonctions de Hankel de premier et deuxième ordres. Etant donné que nous considérons un problème sans sources à l'infini, on peut exprimer les champs E et H des modes guidés TE et TM uniquement à l'aide de la fonction d'Hankel du premier ordre soit sous la forme (onde sortante correspondant au rayonnement du dipôle) :

$$\begin{aligned} \mathbf{E}_{TE}^i &= e^{jm\theta} B_{TE}^i(z) H_0^{(1)}(k_0 n_{eff} \rho) \mathbf{e}_\rho \\ \mathbf{H}_{TM}^i &= e^{jm\theta} B_{TM}^i(z) H_0^{(1)}(k_0 n_{eff} \rho) \mathbf{e}_\rho \end{aligned} \quad \text{Eq. 2.44.}$$

où m représente l'ordre de la symétrie selon l'axe (Oz) qui est ici égal à 1 (symétrie de 2π), et $H_0^{(1)}$ représente la fonction de Hankel du premier ordre.

Les équations de Maxwell-Faraday $\text{rot}\mathbf{E} = -\mu_0 \frac{\partial \mathbf{H}}{\partial t}$ et de Maxwell-Ampère $\text{rot}\mathbf{H} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}$ permettent ensuite de déduire les champs magnétiques associés aux modes guidés TE et TM :

$$\begin{aligned} H_{\text{TE}}^i &= \frac{1}{i\omega\mu_0} \frac{dB_{\text{TE}}^i(z)}{dz} H_0^{(1)}(k_0 n_{\text{eff}} \rho) \begin{Bmatrix} \cos \theta_p \\ -\sin \theta_s \end{Bmatrix} \\ H_{\text{TM}}^i &= B_{\text{TM}}^i(z) H_0^{(1)}(k_0 n_{\text{eff}} \rho) \begin{Bmatrix} \cos \theta_p \\ +\sin \theta_s \end{Bmatrix} \end{aligned} \quad \text{Eq. 2.45.}$$

A partir de la décomposition en ondes planes en coordonnées cylindriques donnée par Hellen (formules 26, 27 et 28 de Hellen 1987) et de l'équation 2.45 il est alors possible de calculer l'intégrale de recouvrement donnée à l'équation 2.41 pour les différents modes guidés de la structure sous réserve de connaître le profil de ces modes guidés.

2.5.4.2. Premières simulations

Afin de confirmer les ordres de grandeurs obtenus au paragraphe 2.5.3.3, nous allons calculer l'énergie couplée dans les modes guidés supportés par la structure des capteurs développés par Gachet et Seiler.

Pour cela, nous utilisons les calculs des profils des modes guidés de ces structures réalisés par A. Morand.

La structure utilisée par Gachet offre la possibilité de coupler de l'énergie dans 3 modes guidés TE et 3 modes guidés TM. En effet, si on observe de plus près la zone où se trouvent les pics des modes guidés de la Figure 2.35 représentant le spectre de puissance émise par un ensemble de dipôles situés à l'interface du composant utilisé par Gachet, on observe que chaque pic est double et correspond à un mode TE et un mode TM. Le calcul du profil de ces six modes donne alors :

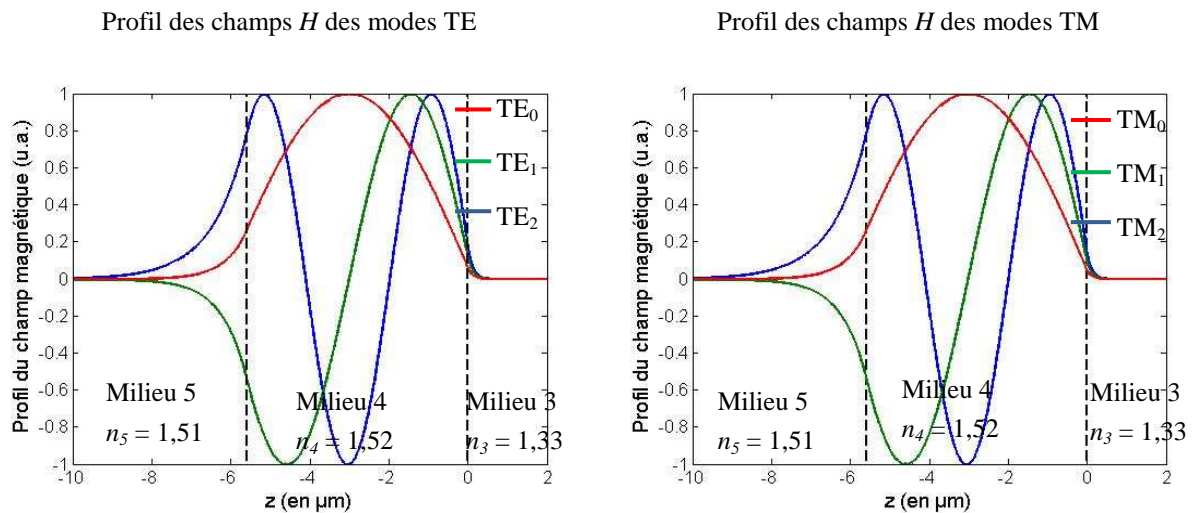


Figure 2.40. Profils normalisés des champs magnétique des trois modes TE et des trois modes TM supportés par la structure du composant développé par Gachet. Ces calculs ont été réalisés par A. Morand.

A partir de ces profils, nous pouvons déjà réaliser une première observation : la queue évanescente dans le milieu 3 (milieu où sont situés les dipôles) des modes guidés est faible en comparaison de celle dans le milieu 5. En effet, lors de la propagation de modes guidés à l'intérieur d'un guide plan asymétrique compris entre deux milieux d'indice de réfraction différents, le profil des modes guidés aura tendance à se décaler vers le milieu d'indice de réfraction le plus fort. Dans ce cas, l'indice de réfraction de la lame de verre étant plus important que l'indice du milieu extérieur, les modes guidés pénètrent plus profondément dans la lame de verre.

Or le couplage de l'énergie des dipôles dans les modes guidés provient du recouvrement entre les profils de ces modes et les champs évanescents émis par les dipôles. Le couplage dans ces modes guidés est donc d'autant plus faible que les profils de ces derniers sont décalés vers la lame et non vers le milieu où sont situées les dipôles. Cela va donc bien dans le sens du calcul réalisé dans le paragraphe précédent à l'aide de la densité de puissance émise par les dipôles.

Calculons, à présent, le recouvrement entre ces profils et les champs évanescents émis par les dipôles et ce suivant l'altitude de ces derniers par rapport au composant.

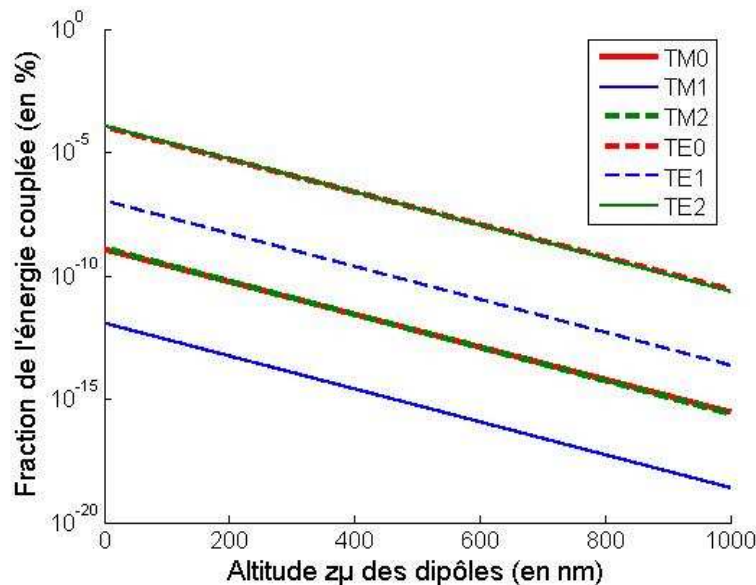


Figure 2.41. Fraction de l'énergie émise par les dipôles situés à une altitude z_μ du composant dans les différents modes guidés supportés par la structure développée par Gachet. Le graphique est en échelle semi-logarithmique.

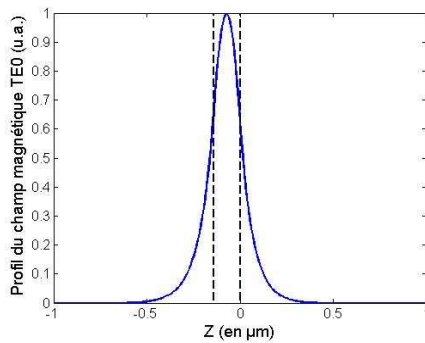
Plusieurs remarques peuvent être faites à partir de cette figure :

- on observe le caractère évanescent du couplage de l'énergie des dipôles dans les modes guidés (droite en échelle semi-logarithmique). Cela vient du fait que l'énergie émise dans ces modes est issue du couplage des champs évanescents des dipôles qui décroissent exponentiellement quand la distance surface-dipôles augmente,
- très peu de signal est couplé dans les modes guidés de la structure. En effet, on trouve, pour une altitude de dipôle de 10 nm, que moins de 10^{-4} % de l'énergie des dipôles se retrouve couplée dans les modes guidés. Cette valeur, bien que supérieure à l'estimation faite précédemment, confirme que peu d'énergie se retrouve confinée dans les modes guidés par rapport à l'énergie couplée dans le substrat.

Très peu de fluorescence se retrouve donc couplée dans les modes guidés d'une telle structure par rapport à l'énergie couplée dans le substrat. Les remarques faites dans le paragraphe précédent restent donc valables. Ce système, du fait de l'excitation globale du composant, est limité par le signal de fond provenant du couplage de l'énergie des dipôles dans le substrat par rapport à la faible quantité de signal couplée dans les guides d'onde.

Dans le cas de la structure utilisée par Seiler, deux modes, l'un TE_0 et l'autre TM_0 peuvent se propager dans la couche de Nitrure de Silicium. Pour le mode TE_0 , on calcule les profils et recouvrements avec les champs évanescents suivants du dipôle :

Profil du champ magnétique du mode TE_0



Profil du champ magnétique du mode TM_0

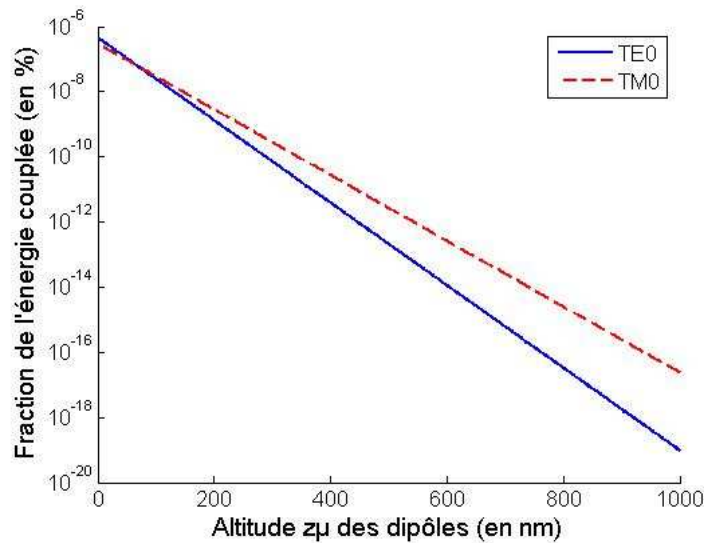
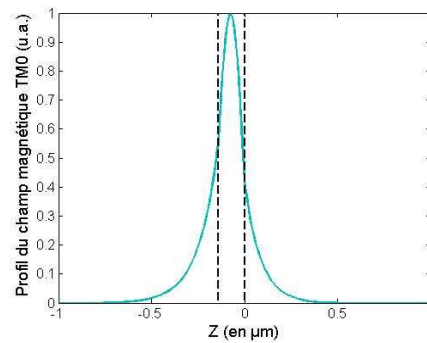


Figure 2.42. Profil du mode TE_0 supporté par la couche de Nitrure du composant développé par Seiler et calcul de la fraction de l'énergie couplée dans ce mode en fonction de l'altitude des dipôles.

On trouve à nouveau que très peu de signal des dipôles est couplé dans le mode guidé TE_0 de la couche de Nitrure du composant développé par Seiler. En effet, on calcul qu'au maximum 10^{-6} % de l'énergie émise par le dipôle est couplé dans les modes guidés de la couche de Nitrure. Cette valeur, bien que supérieur à l'estimation réalisée précédemment, reste très faible. Les remarques précédentes sur la faible quantité de signal couplée dans les modes guidés par rapport à l'énergie couplée dans la couche de Silice sont donc confirmées par ce calcul. Ces calculs confirment ainsi l'intérêt d'exciter tour à tour chacun des plots biologiques d'une même puce afin de maximiser le contraste sur le signal spécifique parvenant au détecteur en bout de composant au lieu d'utiliser un ensemble de guides d'onde ne collectant qu'une très faible fraction du signal.

Toutefois, les calculs réalisés nous donnent seulement la valeur minimale de l'énergie couplée dans les modes guidés. En effet, nous avons fait l'hypothèse qu'il n'y a pas de dispersion des modes guidés autour de leur vecteur d'onde afin de simplifier notre modèle. Or une dispersion de ces modes autour de leur vecteur d'onde offre la possibilité à d'autres ondes planes du dipôle de se coupler dans le paquet de modes rayonnés constituant désormais les modes guidés, augmentant alors la quantité d'énergie totale pouvant être émise dans la couche mince. La prise en compte d'une telle dispersion ne peut cependant pas augmenter énormément la valeur du couplage calculée ici ce qui sera vérifié expérimentalement (voir § 3.3.4.4).

2.5.5. Mise en place des modèles théoriques – Conclusion

Grâce aux données de la littérature, nous avons mis au point trois modèles de calculs complémentaires en entre.

Les travaux de Benisty et al. (Benisty 1998 a) nous ont tout d'abord, permis de développer une méthode de calcul afin de simuler les propriétés d'émission en champ lointain d'un dipôle situé dans une cavité asymétrique. Cela nous permettra d'étudier les propriétés spatiale et spectrale d'émission de sources OLED situées ou non à l'intérieur d'une cavité Fabry Pérot afin d'en étudier les effets et, plus précisément, la possibilité d'améliorer la directivité et de réduire l'intervalle spectral d'émission de ces sources.

Toutefois, ce modèle ne nous permet pas de décrire précisément les phénomènes en champ proche responsables de la collecte de la fluorescence dans une lame de verre ainsi que le couplage dans les éventuels modes guidés supportés par le composant. Nous avons donc élargi un modèle développé en premier lieu par Ford et Weber (Ford 1984) afin de décrire les différentes voies de relaxation possibles, radiatives et non radiatives, pour un dipôle situé dans une cavité asymétrique. Cela nous permettra alors d'étudier les effets d'une couche mince de fort indice de réfraction sur la collecte de la fluorescence dans le composant. De plus, ce modèle nous a permis de montrer les avantages de la méthode de mesure développée au laboratoire vis-à-vis d'instruments similaires utilisant un ensemble de guide d'onde pour collecter le signal de fluorescence des plots biologiques.

Les résultats inattendus de cette comparaison nous ont enfin amenés à développer un troisième modèle basé sur la théorie des modes couplés afin d'estimer la quantité d'énergie pouvant être collectée par des guides d'onde. Nous avons ainsi montré théoriquement que très peu de signal pouvait être couplé dans une couche mince de fort indice de réfraction située à la surface du composant ce qui nous a amené aux conclusions suivantes :

- les systèmes développés par Seiler (Seiler 2006) et Gachet (Gachet 2004) permettent de collecter qu'une très faible quantité de signal spécifique des plots fluorescents par rapport à l'instrument développé au laboratoire,
- la collecte dans le substrat de la fluorescence de l'ensemble des plots biologiques nuit fortement aux performances de ces instruments en détériorant le contraste du signal en bout de lame.

La solution qui semble être la plus adaptée est donc de collecter le signal dans tout le substrat et de dissocier le signal des différents plots biologiques du composant en les excitant tour à tour ce qui correspond à la méthode de mesure utilisée au laboratoire.

Toutefois, au vu des nombreuses réalisations utilisant des guides d'onde pour collecter le signal de fluorescence de plots biologiques, ces derniers résultats doivent faire l'objet d'une caractérisation expérimentale afin de confirmer les résultats théoriques. Cette étude sera menée au cours du chapitre 3.

En conclusion, ces différents modèles mis au point au cours de ce chapitre nous permettrons d'étudier à la fois les propriétés de sources OLED situées dans une cavité Fabry Péro et les phénomènes de champ proche responsable de la collecte de la fluorescence dans notre instrument. Ces simulations, confirmées par des caractérisations expérimentales au cours du prochain chapitre, permettrons alors, dans le futur, de faciliter le dimensionnement de composants dans le but d'optimiser les performances de détection, de robustesse et de compacité de l'instrument développé au laboratoire.

2.6. Conclusion

Ce chapitre a été consacré à la mise en place de modèles théoriques permettant d'étudier les deux parties constituant mon travail de thèse :

- la collecte du signal de fluorescence dans le composant de l'instrument développé au laboratoire,
- les propriétés d'émission de sources OLED situées ou non dans une cavité Fabry Péro.

L'analyse de ces deux problèmes nous a, tout d'abord, permis de définir une structure commune, les cavités asymétriques, permettant de modéliser à la fois les configurations :

- d'un dipôle situé à l'interface d'un milieu massif
- d'un dipôle situé dans une cavité Fabry Péro.

Une analyse qualitative des effets des propriétés d'émission de sources OLED sur les performances de l'instrument développé au laboratoire a, ensuite, permis de déterminer les besoins en filtrage et en directivité des sources d'excitation en vue de leur intégration dans le composant de l'instrument. Cette étude nous servira par la suite à déterminer si une cavité Fabry Péro peut permettre de suffisamment modifier les propriétés d'émission des OLED pour leur intégration dans l'instrument.

Enfin, trois modèles théoriques ont été développés à partir de données de la littérature afin de simuler l'ensemble des phénomènes d'émission d'un dipôle situé dans une cavité asymétrique. Cela nous a alors permis de montrer l'avantage de notre méthode de mesure vis-à-vis de systèmes similaire utilisant un ensemble de guides d'onde pour collecter le signal de fluorescence. Les résultats de cette étude feront l'objet d'une caractérisation expérimentale au cours du chapitre 3 afin d'en confirmer les conclusions.

Chapitre 3. Etude expérimentale de l'instrument et modélisation

3.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude théorique et expérimentale de l'instrument présenté au paragraphe 1.9.1 qui intègre les sources d'excitation dans le composant et utilise une couche mince de fort indice de réfraction pour optimiser la collecte et confiner le signal de fluorescence à sa surface.

Pour rappel, cet instrument est représenté sur la figure suivante :

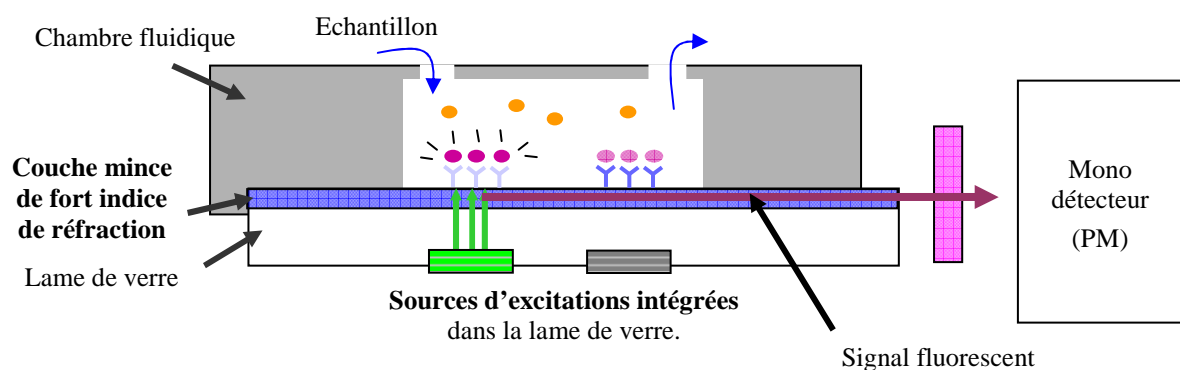


Figure 3.1. Schéma de l'instrument dont on a étudié les performances possibles au cours du travail de thèse présenté dans ce mémoire.

Afin de simplifier l'étude de cet instrument, nous avons dissocié les caractérisations des propriétés d'excitation des plots biologiques des propriétés de collecte du signal de fluorescence par le composant.

Dans un premier temps, nous allons présenter les différents types de mesures que nous avons réalisé au cours de l'étude. Cela nous permettra de décrire brièvement les différents bancs de mesure qui ont été mis au point au cours du travail de thèse.

Nous nous intéresserons ensuite aux propriétés de collecte du signal de fluorescence par le composant. Une étude des différents phénomènes du couplage en champ proche de l'émission d'un dipôle dans une lame de verre sera réalisée grâce à une série d'expériences et de simulations qui nous permettront de caractériser les effets d'une couche mince de fort indice de réfraction sur les performances de l'instrument développé au laboratoire.

Enfin, une étude théorique et expérimentale des propriétés d'émission de sources OLED situées ou non à l'intérieur d'une cavité Fabry Péroต์ sera effectuée. Cela nous permettra de conclure sur les possibilités d'intégrer des sources d'excitation de type OLED directement dans le composant de l'instrument développé au laboratoire.

3.2. Mise au point de bancs de mesures

3.2.1. Etude des différentes mesures à réaliser

Afin d'étudier les propriétés d'excitation et de collecte du signal de fluorescence par l'instrument présenté sur la Figure 3.1, plusieurs types de mesures ont été réalisées.

Pour la collecte du signal de fluorescence par le composant, deux types de mesures ont été menées :

- la caractérisation de l'efficacité de la collecte du signal de fluorescence suivant le type et la structure du composant utilisé,
- la caractérisation de la répartition du signal à l'intérieur du composant et de son éventuel confinement à l'intérieur de la couche mince de fort indice de réfraction.

Pour cela, deux bancs de mesures ont été montés, permettant, d'une part, d'étudier l'efficacité de collection du signal de fluorescence ("banc microscope") et, d'autre part, de caractériser la répartition du signal guidé dans le composant ("banc en champ proche").

Dans le cadre de l'étude des propriétés spectrale et spatiale d'émission d'une OLED un troisième banc de mesure a été développé. Ce banc a permis de caractériser à la fois les propriétés spectrale et spatiale d'émission des différentes OLED que nous avons fabriquées en collaboration avec un département du CEA Grenoble (le DIHS) et avec deux laboratoires de l'université Claude Bernard de Lyon 1 (le LPCML et le LPMCN).

Une description rapide du principe de ces trois bancs de mesures va être effectuée dans les paragraphes suivants. Nous nous rapporterons à l'Annexe A pour une description plus détaillée de ces montages.

3.2.2. Banc microscope

Le but de ce banc de mesure est de pouvoir comparer l'efficacité de collection et de guidage du signal de plots fluorescents selon les caractéristiques du composant sur lequel ils sont situés.

Pour cela, ce banc utilise deux voies de mesure :

- une voie de référence liée à une mesure spécifique et maîtrisée,
- une voie de mesure en bout de composant, conformément au principe de détection de l'instrument développé au laboratoire.

La voie de référence va permettre de normaliser les signaux en bout de lame suivant le niveau de fluorescence des plots excités et de comparer différentes structures de composants entre elles.

Un microscope à épi-fluorescence, c'est-à-dire utilisant une voie d'excitation et de collection de la fluorescence perpendiculaire au substrat (voir Figure 3.2), a été choisi comme voie de référence. En effet, nous maîtrisons parfaitement la chaîne optique d'un tel instrument, et son utilisation en tant que scanner nous permet d'exciter tous les plots d'une puce indépendamment et avec une puissance d'excitation égale. De plus, la mesure de la

fluorescence perpendiculairement au substrat nous affranchit des problèmes de perte de signal suivant la position du plot sur le composant et de qualité de bord sur le guidage du signal en bout de lame (voir paragraphe 1.8.2). Cette mesure nous permet ainsi de corriger les différences de niveaux de fluorescence entre les plots et donc de pouvoir comparer l'efficacité de collection et de guidage de la fluorescence de différentes structures de composants.

Ce banc de mesure, que nous nommerons "banc microscope", est représenté sur la Figure 3.2 et est composé :

- d'un microscope à épi-fluorescence servant de voie d'excitation et de voie de mesure de référence,
- d'un détecteur positionné en bout de composant selon le principe de mesure de l'instrument développé au laboratoire,
- d'une platine de translations deux axes XY permettant d'exciter les différentes zones fluorescentes d'un même composant.

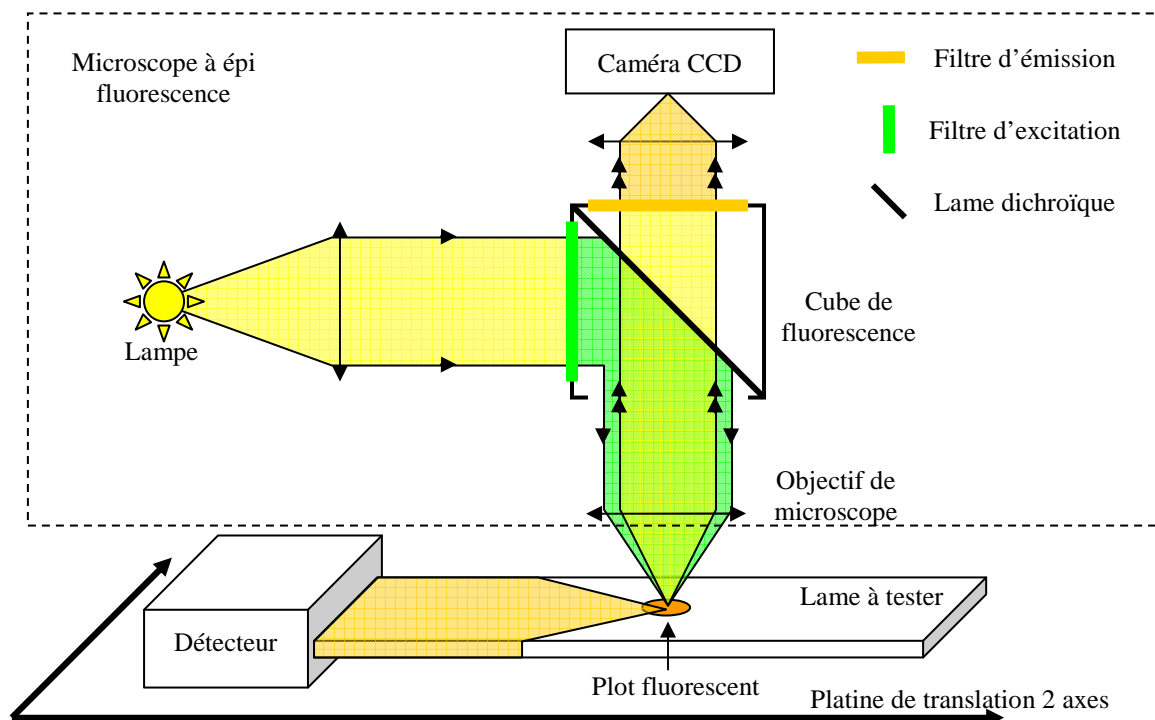


Figure 3.2. Schéma du banc de mesure "microscope". Ce banc utilise un microscope à épi-fluorescence afin, d'une part, d'exciter les plots fluorescents présents sur la lame à tester et, d'autre part, d'obtenir une voie de référence pour normaliser les mesures effectuées en bout de lame. Une platine de translation deux axes (XY) permet de déplacer la lame sous le microscope pour exciter les différentes zones fluorescentes présentes sur la lame.

3.2.3. Banc en champ proche

Nous voulons utiliser une couche mince de fort indice de réfraction sur la surface de la lame afin de confiner le signal dans cette dernière et ainsi éviter les pertes de signal dans les structures des sources d'excitation intégrées dans la face opposée de la lame (voir Figure 3.1). Cependant, l'analyse réalisée au paragraphe 2.5.4 montre que très peu de signal est couplé dans une telle couche mince. Pour confirmer ce résultat théorique, nous avons donc monté un banc de mesure permettant de déterminer la répartition du signal dans la lame et ainsi connaître la quantité de signal pouvant être couplée dans une telle couche mince.

Ce banc de mesure utilise le même principe de voie de référence que le "banc microscope" décrit précédemment. Une fibre optique située à quelques micromètres de la face de sortie de la lame permet, quant à elle, la mesure en champ proche du signal en bout de composant. En translatant cette fibre selon la largeur de la tranche de la lame il est possible de déterminer le profil de la répartition du signal dans cette dernière.

Une mesure en champ proche est utilisée car il est très difficile par un système d'imagerie situé loin de la lame de résoudre suffisamment des structures de très petite taille (de 100 à 400 nm pour les couches minces utilisées).

Ce banc de mesure, que nous nommerons "banc microscope", est représenté sur la Figure 3.3 et est composé :

- d'une voie de référence perpendiculaire au substrat réalisée à l'aide d'une caméra CCD et d'un objectif de caméra,
- d'un spectromètre à fibre permettant la mesure en champ proche du signal en sortie de lame,
- d'une platine de translations un axe permettant de scanner l'ensemble de la hauteur de la face de sortie de la lame.

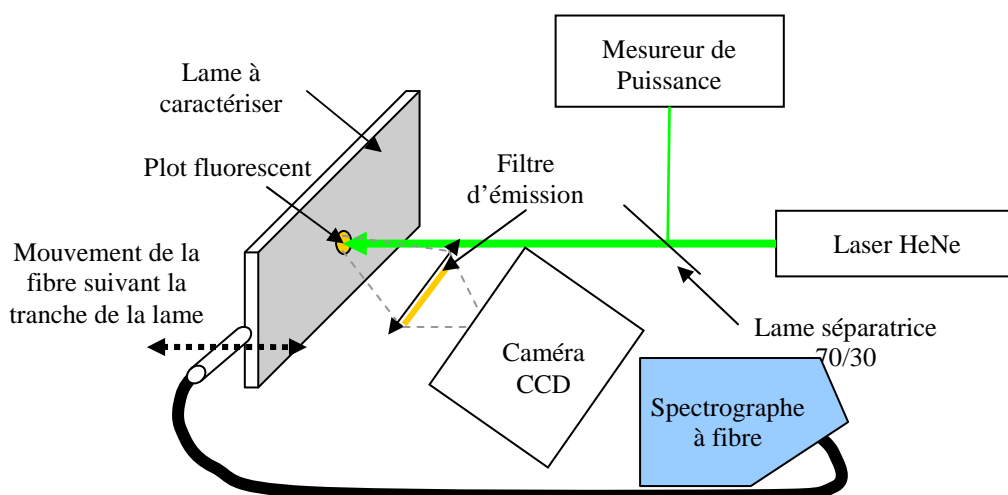


Figure 3.3. Schéma du banc "champ proche". Ce banc est constitué d'un laser comme source d'excitation, d'un système d'imagerie normal au substrat et d'un système de mesure en champ proche en sortie de lame résolue spectralement.

3.2.4. Spectrogoniomètre

Dans le cadre de l'étude des effets d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED, un dernier banc a été mis au point au cours du travail de thèse. Ce banc a pour but de mesurer à la fois les propriétés spectrale et spatiale d'émission d'une OLED.

Pour cela, l'échantillon à caractériser est placé sur l'axe d'une platine de rotation. Un bras déporté tournant autour de cet axe et sur lequel sont positionnés un objectif de collection et une fibre optique reliée à un spectromètre permet alors de mesurer le spectre ainsi que le diagramme d'émission de l'échantillon (voir Figure 3.4).

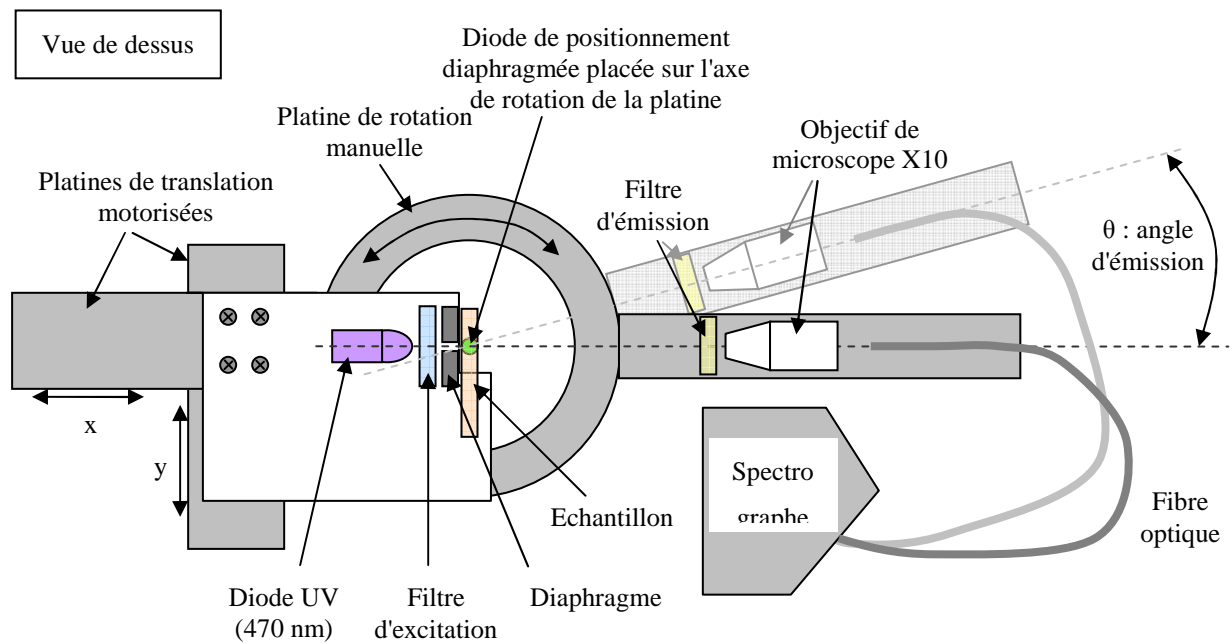


Figure 3.4. Schéma de principe du banc de mesure "spectro-goniométrique" développé pour la caractérisation des effets d'une cavité Fabry Péro sur les propriétés d'émission d'une OLED. Ce banc composé d'un goniomètre et d'un spectromètre à fibre permet de caractériser à la fois les propriétés spectrale et spatiale d'émission des échantillons testés.

Un système permettant d'exciter l'échantillon de manière constante a par ailleurs été réalisé. Nous n'avons cependant pas pu réaliser de comparaison de la puissance émise entre nos différents échantillons à cause de :

- leurs structures différentes impliquant une excitation différente de leurs centres émetteurs,
- leurs très faibles rendements lumineux,
- leurs faibles durées de vie impliquant une dégradation rapide et non contrôlé de leurs performances.

3.3. Collecte du signal de fluorescence dans le composant

Dans ce paragraphe, nous allons décrire les propriétés de collecte du signal fluorescent par le composant de l'instrument développé au laboratoire et étudier l'intérêt d'utiliser une couche mince de fort indice de réfraction sur la surface du composant.

Dans un premier temps, nous allons regarder l'influence de l'orientation du dipôle sur la quantité de signal pouvant être couplée dans les modes de substrat de la lame. Puis, nous vérifierons, de manière théorique et expérimentale, que la quantité de signal pouvant être couplée dans la lame dépend fortement de l'altitude du dipôle.

Une analyse de l'influence de l'indice de réfraction de la lame de verre sur la quantité de signal pouvant être couplée dans la lame et sur la dépendance de ce couplage avec l'altitude des dipôles sera ensuite réalisée.

Cette étude nous amènera à la caractérisation théorique et expérimentale de composants possédant une couche mince de fort indice de réfraction sur leur surface. Nous montrerons alors qu'une telle couche mince permet d'améliorer le rapport signal sur bruit en bout de composant, mais pas de confiner le signal en surface de

composant.

3.3.1. Influence de l'orientation du dipôle

Etudions l'influence de l'orientation du dipôle sur la quantité de signal pouvant être couplée dans la lame de verre. Pour cela, nous considérons une lame de verre simple à l'interface de laquelle sont positionnées deux dipôles orientés perpendiculairement et parallèlement à cette dernière (voir Figure 3.5).

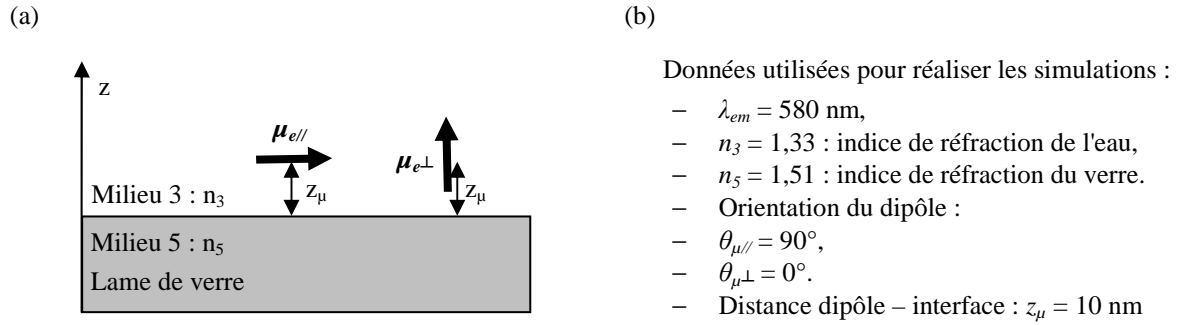


Figure 3.5. Schéma de principe (a) et données (b) des simulations réalisées pour deux dipôles à l'interface d'une lame de verre simple d'indice de réfraction 1,51. Deux orientations de dipôles sont considérées ici : parallèle à l'interface ($\mu_{e//}$) et perpendiculaire à l'interface ($\mu_{e\perp}$).

Le calcul du diagramme d'émission de ces dipôles à l'aide du modèle développé à partir des travaux de Benisty et al. donne :

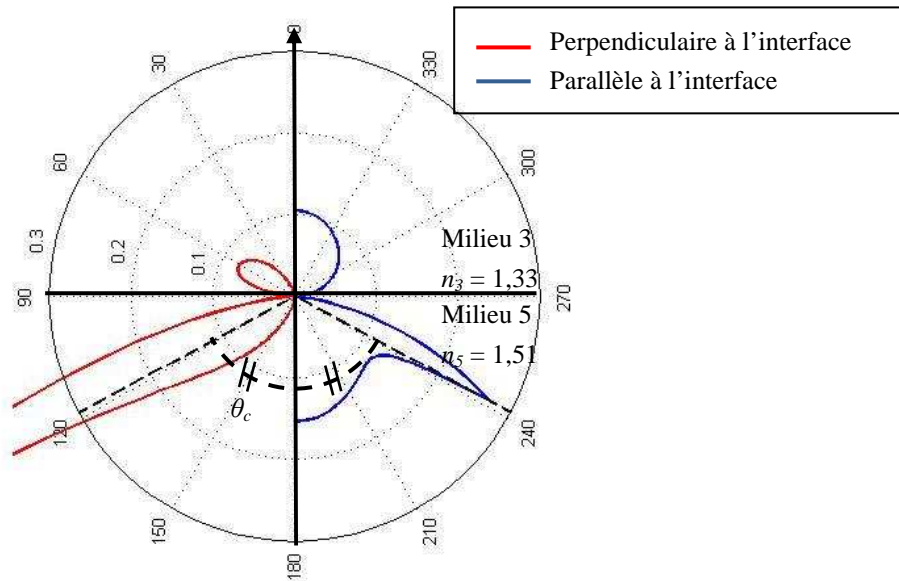


Figure 3.6. Diagrammes d'émission pour deux dipôles à l'interface entre de l'eau (milieu 3) et une lame de verre (milieu 5) pour deux orientations de dipôle (c'est en fait une coupe de l'indicatrice 3D selon un plan d'observation à azimut ϕ constant). On a également reporté les deux droites qui matérialisent l'angle critique θ_c de réflexion totale qui sépare l'émission sous-critique (c'est-à-dire pour des angles inférieurs à θ_c) de l'émission sur-critique (c'est-à-dire pour des angles d'émission supérieurs à θ_c) qui est guidé par réflexion totale dans la lame de verre. Les courbes d'émission dans le substrat ont été tronquées pour plus de visibilité.

On note que :

- l'orientation du dipôle joue un rôle prépondérant sur son diagramme d'émission à l'interface d'une lame de verre. Cela est particulièrement critique lorsque l'on désire effectuer des mesures normalement au

substrat (par exemple à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence ou d'un scanner). En effet, si le dipôle est perpendiculaire à l'interface, très peu de signal sera collecté normalement au substrat. Par contre, cela est moins critique pour l'instrument que nous avons mis au point, puisqu'une part non négligeable de la fluorescence est systématiquement couplée dans la zone sur-critique (et donc guidée dans la lame de verre) quelle que soit l'orientation du dipôle (voir Figure 3.7),

- quelle que soit l'orientation du dipôle, la plus grande partie de son énergie est émise dans le substrat : entre 51 et 64 % de l'énergie est émise vers le substrat suivant l'orientation du dipôle (voir Figure 3.7). Ceci est d'autant plus vrai que le contraste d'indice de réfraction n_5/n_3 est grand (comme nous le verrons dans le paragraphe suivant).

Si on intègre l'énergie émise par le dipôle dans les différents domaines d'émission définis au paragraphe 2.5.3.2, on trouve :

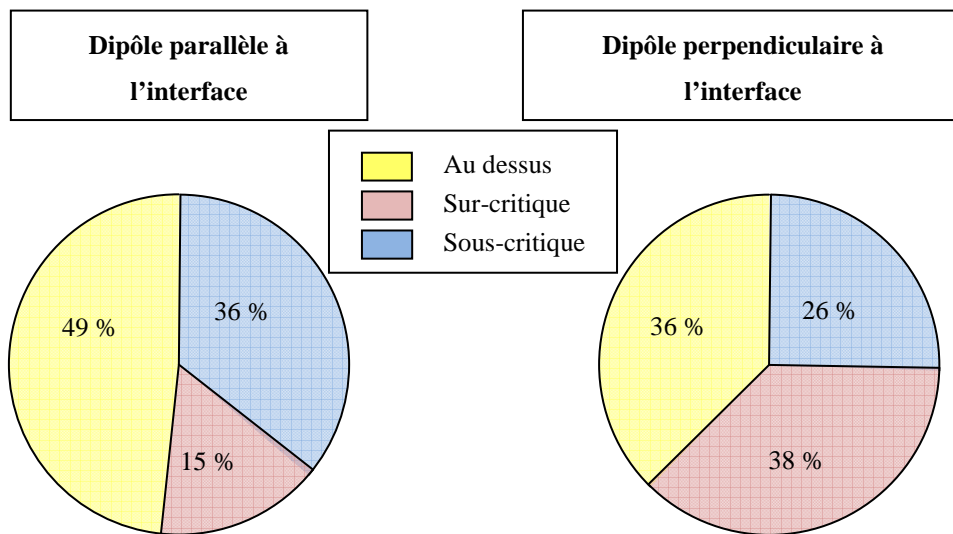


Figure 3.7. Répartition de la fluorescence émise par un dipôle à l'interface d'une lame de verre suivant son orientation : parallèle (figure de gauche) ou perpendiculaire (figure de droite) au substrat.

L'orientation du dipôle joue donc un rôle important sur la quantité d'énergie pouvant être couplée dans la lame de verre : un dipôle perpendiculaire à la surface verra une part bien plus importante de son énergie couplée dans la lame qu'un dipôle parallèle à la surface.

A partir de ces deux orientations de dipôles il est par ailleurs possible de modéliser l'émission d'un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope. En effet, il est communément admis qu'un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope dans l'espace peut être modélisé par un ensemble de dipôles dont un tiers sont orientés perpendiculairement à l'interface et deux tiers parallèlement à l'interface. Cela se justifie par le fait que tout dipôle peut être décomposé suivant une composante normale à l'interface et deux composantes parallèles à l'interface. La symétrie de révolution de notre système selon l'axe (Oz) fait que les contributions des deux composantes parallèles à l'interface sont identiques.

Le diagramme d'émission d'un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope est :

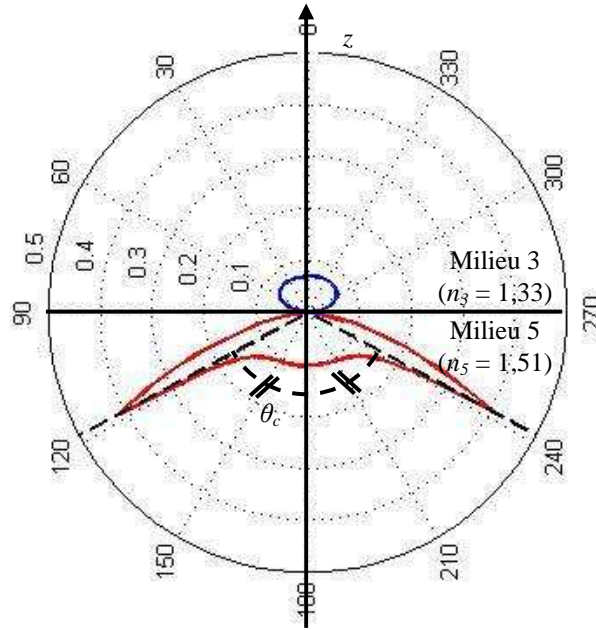


Figure 3.8. Diagramme d'émission pour un ensemble de dipôles orientés aléatoirement par rapport à l'interface (c'est une coupe du diagramme d'émission 3D selon un plan d'observation à azimut φ constant). On a également reporté les deux droites qui matérialisent l'angle critique θ_c de réflexion totale.

On remarque à nouveau qu'une part importante de la fluorescence est émise dans le substrat : environ 34 % de la fluorescence est émise dans la zone sur-critique et est donc guidée dans la lame de verre, ce qui correspond à la valeur avancée par Ruckstuhl et al. pour des conditions identiques (Ruckstuhl 2000).

L'instrument développé au laboratoire, à son stade actuel, permet donc de collecter dans son support environ 30 % du signal des fluorophores situés à la surface de la lame de verre. Seule une fraction de ce signal est ensuite guidée jusqu'au détecteur par réflexion totale sur les bords de la lame. Si l'on considère, en première approximation, que seule l'énergie émise dans le cône de réflexion totale orienté vers le détecteur peut être détectée, alors le système permet de collecter la fraction suivante de signal émis par les plots biologiques :

$$30\% \cdot \frac{2\theta'_c}{2\pi} \approx 7\% \quad \text{Eq. 3.1.}$$

où θ'_c représente l'angle limite de réflexion totale sur les bords de la lame ($\theta'_c = \text{asin}(n_{\text{ext}}/n_5)$ avec $n_{\text{ext}} = 1$).

Pour comparaison les systèmes de détection réalisés à l'aide d'un objectif de microscope perpendiculaire au substrat qui sont classiquement utilisés en laboratoire, ne détectent que 4 % de la fluorescence des plots biologiques à l'aide d'un objectif ouvert à 0,5. La configuration de instrument développé au laboratoire permet donc de collecter une part plus importante de la fluorescence que les systèmes de laboratoire basés sur une détection perpendiculaire au substrat, ce qui doit nous permettre d'atteindre au moins les mêmes performances que ces systèmes.

3.3.2. Influence de l'altitude du dipôle

3.3.2.1. Simulations

Elles sont de deux natures :

- le nombre et la position des lobes d'interférence vont dépendre de l'altitude des dipôles,
- la quantité d'énergie couplée dans la zone sur-critique par des phénomènes de champ proche va dépendre de l'altitude z_μ du dipôle. Cette propriété permet de limiter la contribution de la fluorescence du volume de l'échantillon par rapport au signal de surface spécifique de la détection de cibles.

Sur la Figure 3.9 (a), nous observons en effet une baisse importante de la part de la fluorescence qui est couplée dans le substrat pour des angles supérieurs à l'angle limite de réflexion totale θ_c . On retrouve cette baisse de couplage sur la Figure 3.9 (b) représentant le spectre de puissance émise par le dipôle. En effet, l'énergie couplée dans les modes sur-critiques correspond à l'énergie dissipée pour $n_3/n_3 < u < n_5/n_3$, c'est-à-dire $1 < u < 1,135$. On observe donc bien une diminution de cette quantité d'énergie avec l'altitude du dipôle et on calcule que le couplage dans les modes sur-critiques devient négligeable pour des altitudes de dipôles supérieures à $\lambda_{em}/2$.

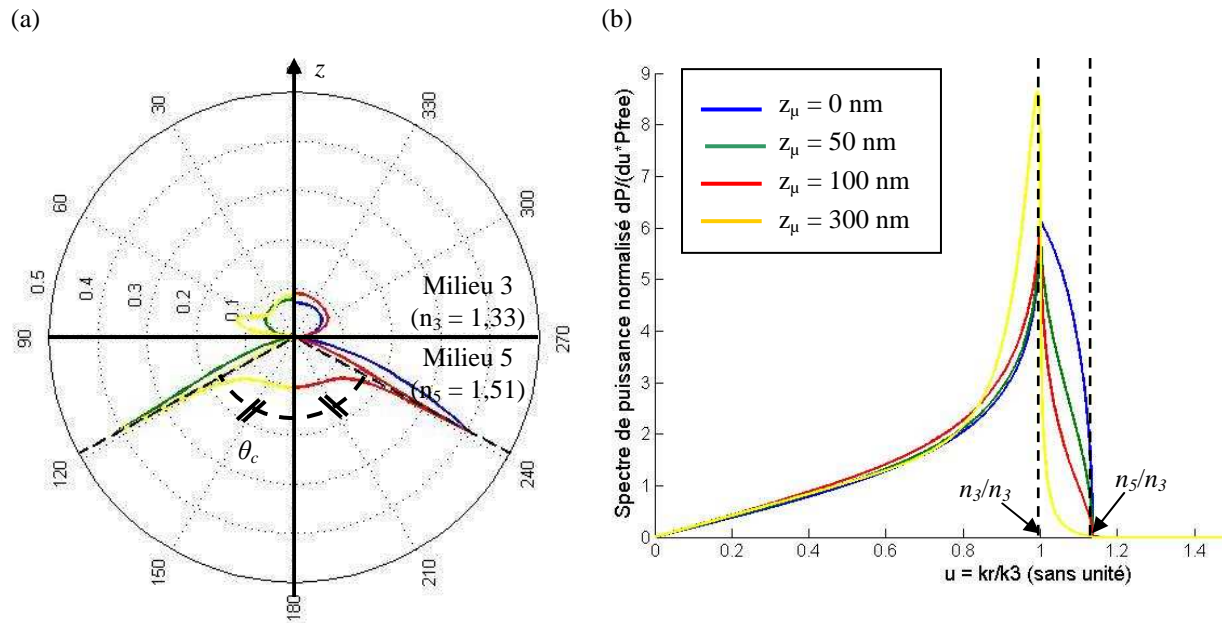


Figure 3.9. Diagramme d'émission (a) et spectre de puissance (b) pour quatre altitudes différentes de dipôle situé sur une interface eau/verre (cas d'un ensemble de dipôles orientés aléatoirement). On a reporté sur la figure (a) les deux droites qui matérialisent l'angle limite θ_c de réflexion totale entre les milieux 3 et 5.

On remarque, par ailleurs, la présence de différents lobes d'émission dans le milieu 3 suivant l'altitude z_μ du dipôle. Ces lobes proviennent, en effet, des interférences entre le champ direct émis par le dipôle et le champ réfléchi sur l'interface qui varient suivant la position du dipôle par rapport à la lame de verre.

Cette forte dépendance du couplage de l'émission des dipôles dans la lame de verre avec leur altitude est une caractéristique importante de notre instrument. Cela permet de discriminer le signal de volume du signal de surface, c'est-à-dire de limiter le couplage dans la lame des signaux d'offset provenant de l'autofluorescence de l'échantillon. De plus, cela permet de détecter les fluorophores uniquement lorsqu'ils sont proches de la surface

de réaction, ce qui améliore la spécificité de nos mesures par rapport à des systèmes collectant l'ensemble de la fluorescence du volume (autofluorescence et fluorophores non spécifiques).

3.3.2.2. Caractérisations expérimentales

Cette dépendance de la quantité d'énergie couplée dans la lame suivant l'altitude du dipôle peut être illustrée grâce au signal collecté par un plot témoin lors d'une expérience d'hybridation de brins ADN sur l'instrument développé au laboratoire.

Matériel et méthode

Nous disposons sur une simple lame de verre quatre plots biologiques selon le plan de dépôt suivant :

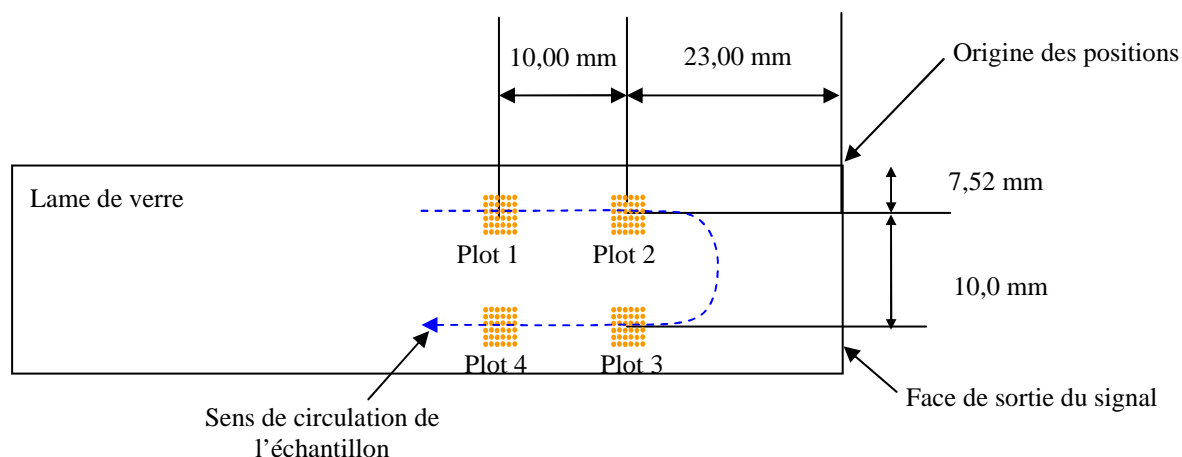


Figure 3.10. Schéma du plan de dépôt des plots biologiques disposés sur le composant de l'instrument quatre plots développé au laboratoire. Afin de réaliser des plots biologiques de grandes tailles nous déposons des matrices de 6 x 6 plots avec un entre axe de 250 μm entre chaque plot. Les plots biologiques ainsi obtenus ont une dimension de 1,4 x 1,4 mm^2 . En bleue est représenté le sens de circulation de l'échantillon au dessus des différentes zones sensibles.

La fonctionnalisation de la surface de la lame a été réalisée suivant le protocole décrit par Schultz et al. (Schultz 2007) qui consiste en quatre principales étapes :

- lavage de la surface de la lame,
- silanisation de la surface de la lame afin de permettre le greffage des brins d'ADN par des liaisons covalentes,
- activation des zones sensibles de la lame, c'est-à-dire des plots 1, 2, 3 et 4,
- désactivation des fonctions silanes présentes hors des zones sensibles.

L'activation des zones sensibles est réalisée en déposant à l'aide d'un robot de "spotting" une matrice de 6 x 6 gouttes de 636 pL de solution contenant les sondes de captures afin de réaliser des plots de 1,4 x 1,4 mm^2 . Les sondes de captures sont des oligomères (simple brin d'ADN) complémentaires des brins d'ADN cibles qui seront présents dans l'échantillon. Seule une des zones sensibles, le plot 1, est fonctionnalisée à l'aide d'une solution d'oligomères non complémentaires afin de créer une zone de référence ne réagissant pas avec les brins cibles et permettant de suivre les éventuelles variations de l'instrument ainsi que le couplage de la fluorescence du volume de l'échantillon. La concentration en sondes de capture des solutions déposées sur la lame est de 1 μM

aussi bien pour les brins complémentaires (plot 2, 3, et 4) que pour les brins non complémentaires (plot 1).

Enfin, les solutions utilisées comme tampon et échantillon d'hybridation sont les suivantes :

- le tampon est une solution SSC 0,2x de chez Sigma ayant un pH de 7 et contenant 0,003 M de sels (NaCl),
- l'échantillon d'hybridation est une solution H7140 2x de chez Sigma contenant 10 nM de brins d'ADN complémentaires des sondes de captures déposées sur les zones sensibles, 200 µg/mL de brins d'ADN non complémentaires et 1,65 M de sels. Les brins d'ADN non complémentaires contenus dans cette solution servent à bloquer les sites d'accroche encore présents sur la lame afin de minimiser les adsorptions non spécifiques des brins cibles sur la lame. Enfin, les brins d'ADN complémentaires sont marqués par des fluorophores organiques Cy3 dont le spectre d'émission est donné sur la Figure 1.31.

Le déroulement de l'expérience que nous avons réalisée sur la lame simple est le suivant :

- i. circulation de la solution tampon SSC 0,2x pendant 50 min afin d'attendre la stabilisation du dispositif expérimental (diodes d'excitation, photomultiplicateur, température, ...),
- ii. circulation de la solution d'hybridation contenant 10 nM de brins d'ADN cibles pendant 200 min,
- iii. circulation de la solution tampon de SSC 0,2x pendant 400 min afin d'observer la dissociation des brins ADN cibles hybridés sur les différentes zones sensibles.

Résultats expérimentaux

Le signal de fluorescence obtenu en sortie de la lame simple lors de cette expérience est le suivant (nous avons volontairement omis de tracer le signal du plot 2 car des problèmes de stabilité de la source d'excitation qui lui est associée ont provoqué de fortes variations qui ne nous intéressent pas ici) :

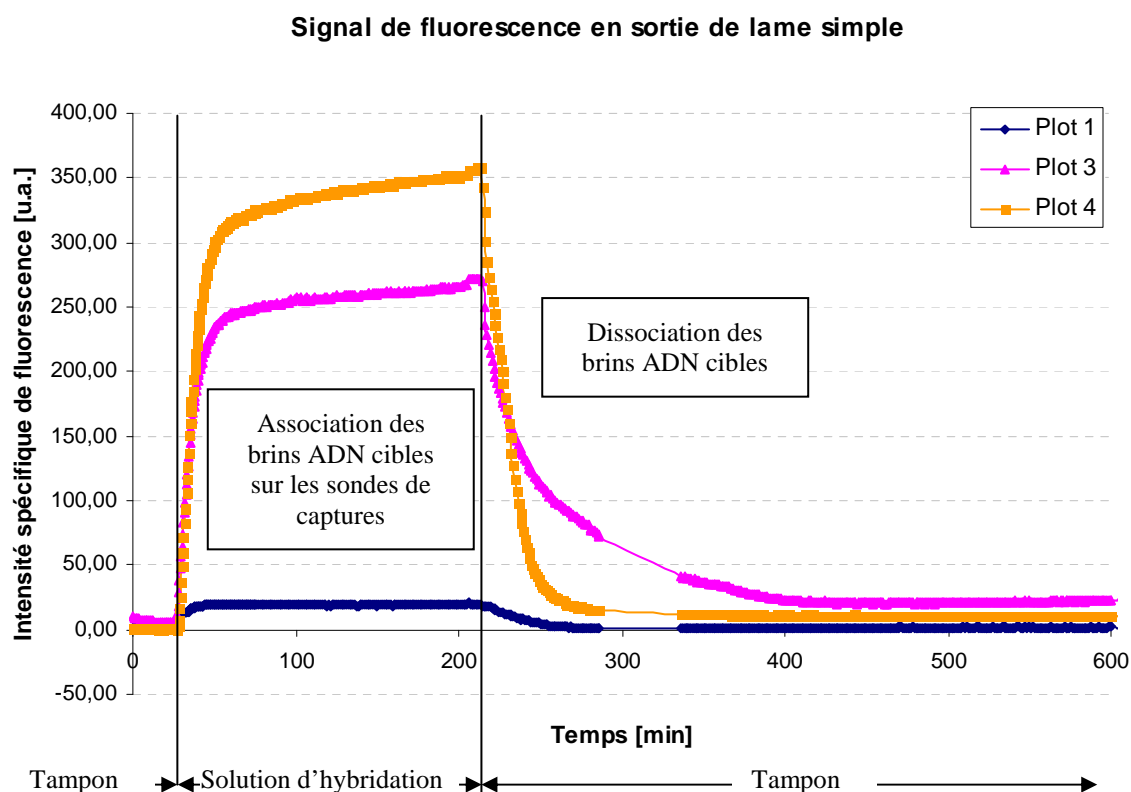


Figure 3.11. Signal de fluorescence en sortie de la lame simple pendant l'expérience d'association ADN/ADN. Le signal issu du plot 2 n'est pas représenté ici à cause de variations trop importantes du signal de la source d'excitation associée entraînant de fortes variations du signal en sortie de lame. Ces courbes ont été corrigées du signal d'offset ambiant afin de représenter uniquement le signal de fluorescence spécifique collecté au niveau de chacune des zones sensibles.

Cette expérience illustre bien le couplage du signal de fluorescence dans la lame de verre ainsi que la discrimination du signal de volume du fait que ce couplage est une interaction en champ proche.

En effet, on observe sur les courbes des plots 3 et 4 l'hybridation des brins complémentaire contenus dans l'échantillon avec les sondes de captures de ces plots. Les brins hybridés étant proches de la surface de la lame, une partie importante de leur signal se retrouve couplée dans cette dernière, augmentant fortement le signal de ces plots. L'évolution de ce signal suit la loi de Langmuir (Schultz 2007) qui définit, à partir des constantes d'association et de dissociation des différentes espèces, les caractéristiques de l'association des cibles et sondes entre elles. Par contre, on n'observe pas la même évolution de signal sur le plot témoin (plot 1). On remarque uniquement une faible augmentation de signal lors de la circulation sur la lame de la solution d'hybridation contenant les brins complémentaires fluorescents. Cette augmentation provient du couplage bien plus faible de la fluorescence de volume issue des brins complémentaires.

On observe donc bien la dépendance en z du couplage de la fluorescence dans la lame puisque seuls les brins hybridés sur la surface de la lame contribuent de manière significative au signal détecté en bout de composant alors que le signal de volume crée seulement un faible signal en sortie de lame pour chacun des plots biologiques.

Enfin, lorsque l'on refait circuler le tampon sur les plots biologiques dont la concentration en sels favorise la dénaturation des doubles brins ADN, on observe la dissociation des brins ADN cibles des plots de capture qui se

traduit par une baisse du signal de fluorescence de ces plots (plots 3 et 4). Sur le plot témoin, on mesure aussi une baisse du signal qui provient du fait que la solution tampon ne contient pas de cibles fluorescentes.

Remarque : les variations de signal et de cinétique de dissociation entre les plots 3 et 4 sont dues à des variations du signal d'excitation, au phénomène de vignetage (voir § 1.8.2), et aux erreurs intrinsèques de la chimie de greffage faisant varier la densité de sondes de capture entre les différents plots.

3.3.3. Influence de l'indice de réfraction de la lame de verre

Regardons, à présent, l'influence de l'indice de réfraction de la lame de verre sur le couplage en champ proche de l'émission d'un ensemble de dipôles orienté de façon isotrope. Pour cela, nous considérons deux types de lame de verre :

- une lame de verre d'indice de réfraction 1,51 qui est l'indice de réfraction du verre BK7 classiquement utilisé pour les lames de microscope,
- une lame de verre d'indice de réfraction 1,8 qui est l'indice de réfraction du verre SF11 (Schott).

Les diagrammes d'émission pour un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope et situés à 10 nm de ces lames de verre sont :

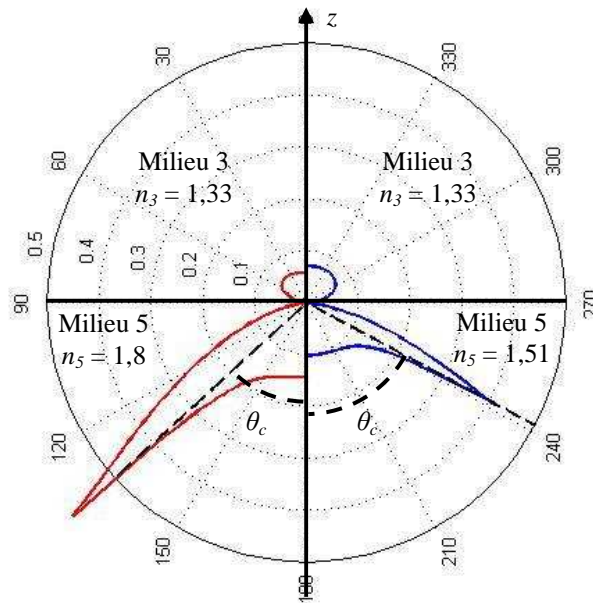


Figure 3.12. Diagramme d'émission d'un ensemble de dipôle orientés de façon isotrope et situés à une altitude de 10 nm par rapport à une lame de verre d'indice de réfraction 1,8 (en rouge) et 1,51 (en bleu). On a également reporté les deux droites qui matérialisent les angles limites de réflexion totale θ_c entre les milieux 3 et 5 et qui séparent l'émission sous-critique (pour des angles inférieur à θ_c) de l'émission sur-critique (pour des angles supérieur à θ_c).

On observe une modification du diagramme d'émission des dipôles suivant l'indice de la lame de verre sur laquelle ils sont positionnés.

De plus, si on compare la quantité d'énergie couplée dans les différents domaines d'émission du dipôle on trouve :

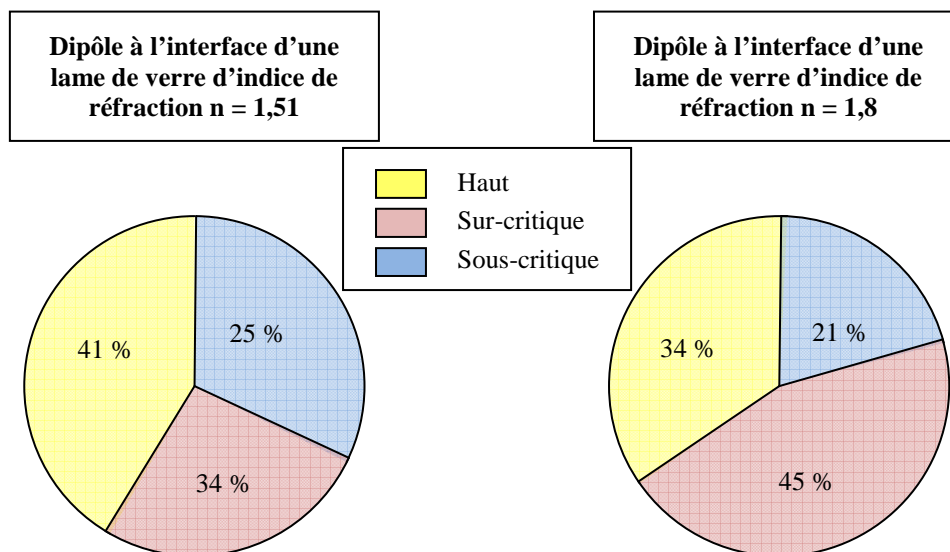


Figure 3.13. Répartition de l'énergie émise par un ensemble de dipôles orientés aléatoirement à l'interface ($z_\mu = 10 \text{ nm}$) d'une lame de verre d'indice de réfraction $n_5 = 1,51$ ou $n_5 = 1,8$.

On en déduit que plus l'indice de réfraction de la lame de verre est important et plus cette dernière va collecter une part importante de l'énergie émise par le dipôle dans sa zone sur-critique.

En effet, lorsque l'on décompose en ondes planes l'émission du dipôle, les modes émis dans la zone sur-critique ont leurs composantes radiales comprises entre la valeur du vecteur d'onde dans le milieu 3 (milieu extérieur) et celle dans le milieu 5 (lame de verre). En augmentant l'indice de réfraction de la lame de verre on augmente la valeur du vecteur d'onde dans le milieu 5 (la valeur du vecteur d'onde dans un milieu d'indice de réfraction n est $\|k\| = n 2\pi/\lambda$). On augmente alors l'intervalle des ondes qui sont propagatives dans le milieu 5 et évanescentes dans le milieu 3 (ondes pour lesquelles $k_3 < k_r < k_5$, c'est-à-dire $1 < u < n_3/n_5$). Les dipôles ont alors plus de possibilités de se dé-exciter dans ces modes, c'est-à-dire dans la zone sur-critique de la lame de verre.

En conclusion, plus l'écart d'indice de réfraction entre le milieu extérieur et la lame de verre est important et plus il sera possible de collecter une part importante de la fluorescence des dipôles dans la lame de verre.

Discrimination du signal de volume du signal de surface

Regardons l'effet du contraste d'indice de réfraction entre le milieu extérieur et la lame de verre sur le couplage de la fluorescence en fonction de l'altitude du dipôle. Pour cela, nous calculons le spectre d'énergie dissipée $dP/du(u)$ d'un ensemble de dipôles orientés aléatoirement à l'interface d'une lame de verre d'indice de réfraction n_5 égal à 1,5 ou 1,8 pour différentes altitudes de dipôles. L'intégration de $dP/du(u)$ sur les différents domaines d'émission possibles des dipôles permet alors de déterminer la répartition de l'énergie émise par les dipôles.

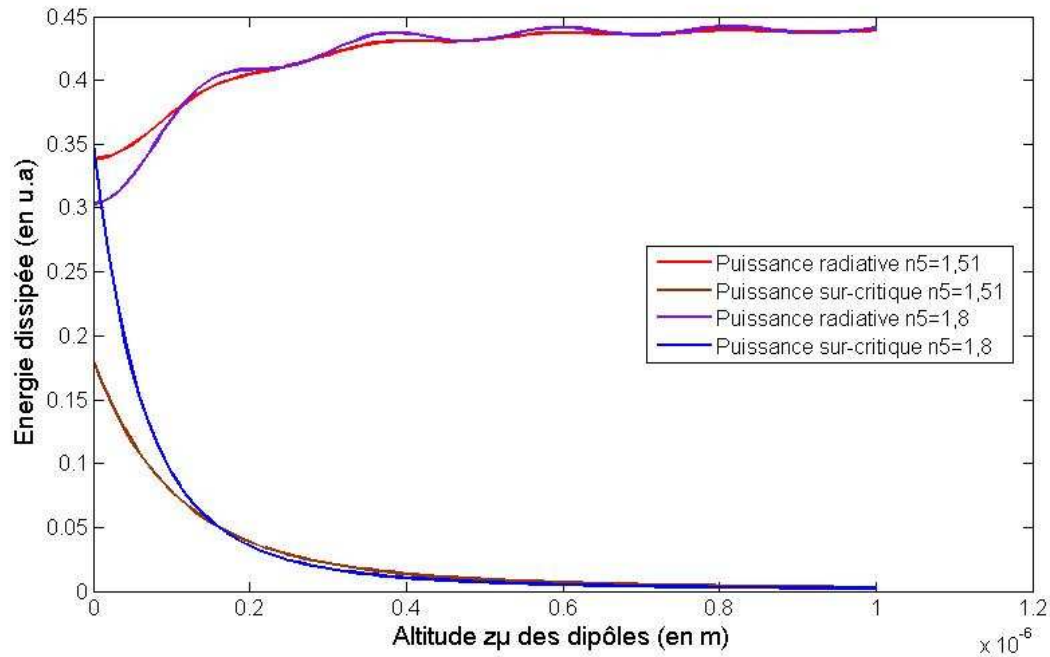


Figure 3.14. Calcul de la puissance émise dans le domaine sur-critique et dans les modes propagatifs dans le milieu extérieur (milieu 3) en fonction de l'altitude du dipôle et de l'indice de réfraction de la lame de verre. Le dipôle émet à 580 nm.

On remarque que :

- l'énergie émise dans les modes propagatifs dans le milieu extérieur (modes pour lesquels $0 \leq k_r \leq k_l$) dépend très peu de l'indice de réfraction de la lame de verre. On remarque, néanmoins, que cette énergie oscille en fonction de l'altitude du dipôle. Ces oscillations sont dues aux interférences entre le champ émis directement par le dipôle et celui réfléchi par la lame de verre (Drexhage 1974). Enfin, on observe une baisse de l'énergie émise dans les modes propagatifs pour de faibles altitudes du dipôle. En effet, pour les faibles distances dipôle – lame de verre, les interactions champ proche entre les dipôles et la lame de verre deviennent importantes, ce qui entraîne un couplage de l'énergie des dipôles dans la lame au détriment d'une émission dans les modes propagatifs,
- le couplage de la fluorescence dans la lame de verre est fortement dépendant de l'altitude z_μ des dipôles par rapport à l'interface. Pour de faibles altitudes, jusqu'à 46 % de l'émission des dipôles est couplée dans une lame d'indice de réfraction 1,8 mais cela diminue de plus de 90 % pour des altitudes supérieures à 200 nm,
- la discrimination du signal de volume vis-à-vis du signal de surface est meilleure dans le cas de la lame de plus fort indice de réfraction. Augmenter le contraste d'indice entre le milieu extérieur et la lame de verre revient donc à réduire le volume de mesure et donc la contribution des signaux de volume.

L'utilisation d'une lame de fort indice doit donc permettre :

- **d'augmenter le signal collecté dans la lame,**
- **d'augmenter la dépendance du couplage de la fluorescence dans la lame de verre suivant l'altitude z_μ du dipôle, c'est-à-dire de diminuer la contribution des signaux non spécifiques du volume de l'échantillon et donc le bruit sur les mesures.**

Ainsi, la diminution du bruit et l'augmentation du signal spécifique doit permettre d'améliorer significativement le rapport signal sur bruit des mesures et donc la sensibilité du système.

L'utilisation de lames de verre ayant un fort indice de réfraction pose cependant plusieurs problèmes : celui de l'approvisionnement des lames et celui de leur coût par rapport à l'utilisation de verres classiques d'indice de réfraction de l'ordre de 1,5. La solution que nous avons choisie est alors d'augmenter le contraste d'indice à la surface de la lame grâce au dépôt d'une couche mince de fort indice de réfraction.

3.3.4. Effet d'une couche mince de fort indice de réfraction

Le but de ce paragraphe est d'étudier l'intérêt de déposer à la surface des composants utilisés dans l'instrument développé au laboratoire une couche mince de fort indice de réfraction afin :

- d'en améliorer les performances de collecte du signal de fluorescence,
- de réduire le volume de mesure et donc améliorer la spécificité de mesure,
- de limiter les interactions du signal couplé dans le composant avec les structures de sources intégrées sur la face opposée de la lame.

Dans un premier temps, les différents types de lame que nous avons eu l'occasion de tester seront présentés. Nous décrirons ensuite les différentes analyses expérimentales ainsi que les simulations que nous avons effectuées afin de caractériser les performances de ces lames dans l'instrument développé au laboratoire.

3.3.4.1. Description des composants testés

Bien que le dépôt d'une couche mince de fort indice de réfraction à la surface de la lame de verre doive permettre d'améliorer les performances de l'instrument développé au laboratoire, ces mêmes couches minces peuvent aussi poser des problèmes :

- les interactions entre le signal guidé dans la couche et la surface de la lame (chimie de greffage, autres plots biologiques, chambre fluidique, support mécaniques, ...) peuvent entraîner des pertes de signal. Pour contourner ce problème, Seiler (Seiler 2006) dépose sur ces guides une couche supplémentaire afin de les isoler et donc de limiter les interactions entre le signal guidé et les éléments présents à la surface de la lame. Cependant, nous montrerons par la suite que ces pertes ont peu d'influence sur la mesure car la fraction d'énergie couplée dans la couche est faible,
- la modification des propriétés chimiques de la surface de la lame par l'ajout d'une couche mince peut entraîner des modifications de la chimie de greffage des molécules biologiques sur la lame de verre. On note ici que des travaux antérieurs réalisés au CEA ont permis de développer une chimie de greffage adaptée au Nitrure ce qui nous permet de minimiser ce problème dans notre cas pour l'utilisation de couches minces en Nitrure de Silicium,
- la modification des propriétés chimiques de la surface peut faire varier les propriétés du transfert d'énergie (FRET) utilisé dans notre protocole (voir § 1.6.2.3). En effet, il a déjà été observé que les propriétés de FRET changent si la réaction est réalisée en milieu homogène ou sur un support solide, ce qui est notre cas (Neuburger 2006). L'ajout d'une couche mince peut donc modifier les performances de notre dosage en fonction de son effet sur ce transfert d'énergie. Ce phénomène n'a pour l'instant pas été

observé par notre équipe et reste une hypothèse.

Nous avons donc choisi de tester deux types de couches minces de faible et fort écart d'indice de réfraction afin d'étudier à la fois l'augmentation du couplage de la fluorescence dans la lame et son éventuel confinement dans la couche mince. Par ailleurs, ces deux types de couches minces nous ont permis d'identifier et de tester deux technologies différentes de réalisation, technologies dont les coûts de production en série peuvent être très différents et qui modifient plus ou moins les propriétés chimiques de surface de la lame.

Ces deux types de couches minces sont :

- une couche mince réalisée par une technique d'échange d'ions,
- Une couche mince en Nitrure de Silicium (Si_3N_4).

Couche mince réalisée par échange d'ions

La technique d'échange d'ions utilisée pour créer une couche de plus fort indice de réfraction sur la surface d'un substrat en verre consiste à faire tremper le substrat en verre dans une solution de sels fondus. Un échange entre certains ions contenus dans le substrat en verre et des ions présents dans la solution de sels fondus va alors avoir lieu, entraînant de légères modifications des propriétés physiques et chimiques de la surface du substrat. Ces modifications se caractérisent généralement par un changement de l'indice de réfraction à la surface du substrat en fonction du type et de la quantité d'ions échangés. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre et peut être appliquée sur de grandes surfaces.

L'échange d'ions qui a été utilisé pour réaliser les composants que nous avons testés est l'échange des ions Na^+ présent dans la lame avec des ions K^+ présent dans la solution de sels fondus. La variation d'indice de réfraction est, dans ce cas, essentiellement due aux contraintes créées dans le verre par l'ion K^+ plus gros que l'ion Na^+ . La variation d'indice de réfraction créée par ce type d'échange est de l'ordre de 10^{-2} .

Une première lame a été réalisée par cette méthode et son profil d'indice de réfraction caractérisé par une technique de M-Lines :

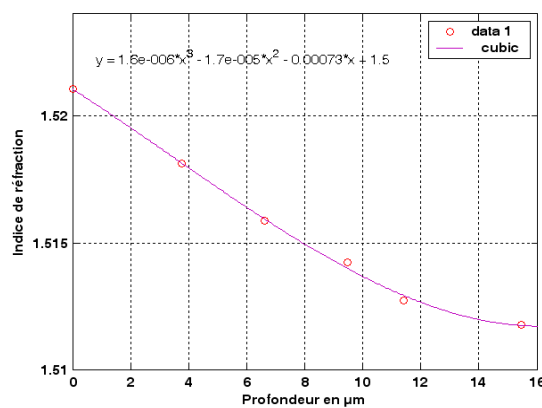


Figure 3.15. Profil de l'indice de réfraction à la surface de la lame de verre sur laquelle un échange d'ions Na^+/K^+ a été réalisé pendant 2 heures à 430°C . Profil réalisé à l'IMEP par A. Moulin et A. Morand par une technique de M-Lines à l'aide d'un laser HeNe à $632,8\text{ nm}$.

A l'aide de ce profil, le coefficient d'interdiffusion D des ions dans la lame de verre a pu être déterminé afin de définir différents temps d'échanges t pour la réalisation de plusieurs profondeurs de guide. Ces couches minces

étant caractérisées par un gradient d'indice de réfraction (décroissant avec la profondeur), la profondeur effective de ces couches est défini par : $x = 2\sqrt{Dt}$.

Trois guides ont alors été réalisés à l'IMEP par A. Morand et A. Moulin de différentes profondeurs :

Profondeur (en μm)	Temps d'échange
5	1h 10 min
10	4h 40 min
20	18h 40 min

Table 3.1 Profondeur des trois guides réalisés par échanges d'ions à l'IMEP par A. Morand et A. Moulin.

En résumé cette technique de réalisation de couche mince permet d'obtenir des guides qui :

- présentent un faible écart d'indice de réfraction avec la lame de verre (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-2}) et qui donc confinent peu le signal en surface de lame,
- utilisent un procédé de fabrication relativement simple et peu coûteux, et qui peut être utilisé sur de très grandes surfaces,
- modifient très peu les caractéristiques chimiques de la lame de verre et donc la chimie de greffage des molécules biologiques sur la lame.

Couche mince en Nitrure de Silicium

La méthode de réalisation des couches de Nitrure de Silicium est, quant à elle, une méthode de dépôt sous vide. De façon succincte, cette méthode consiste à faire évaporer le matériau que l'on veut déposer dans une enceinte sous vide puis à le faire se condenser sur le substrat voulu.

Il existe deux principales méthodes de dépôt sous vide de couches minces :

- par pulvérisation cathodique : cette méthode consiste à bombarder une électrode à l'aide d'un faisceau d'ions. Ce bombardement provoque l'éjection d'atomes du matériau constituant la cathode (pour nous, du Nitrure de Silicium) qui peuvent ensuite se condenser sur un substrat situé en regard de la cathode,
- par évaporation thermique : cette méthode consiste à faire évaporer, dans une enceinte sous vide, le matériau à déposer par un procédé thermique, puis à le faire se condenser sur un substrat froid placé en regard du creuset dans lequel se fait l'évaporation du matériau.

Généralement, un substrat de référence constitué par une balance à quartz est placé à proximité du substrat de travail et permet de contrôler la quantité de matériau déposée et donc l'épaisseur de la couche créée. De nombreux paramètres peuvent influencer la qualité et les caractéristiques optiques (épaisseurs, indice de réfraction) de la couche créée : la qualité du vide, la vitesse d'évaporation des molécules, la température, ...

Toutefois, les couches de Nitrure de Silicium créées par ces techniques présentent généralement de forts coefficients d'absorption aux longueurs d'onde optique, une méthode par CVD permettant de fortement réduire ces absorptions a donc été utilisée pour réaliser les échantillons que nous avons testés.

Les couches minces en Nitrure de Silicium ainsi créées

- présentent un fort écart d'indice de réfraction avec la lame de verre (de l'ordre de 0,6),

- peuvent entraîner un confinement plus important de la fluorescence à la surface de la lame,
- utilisent un procédé de fabrication par évaporation sous vide plus complexe à réaliser qu'une technique d'échange d'ions,
- entraînent une modification de la chimie de la surface de la lame et donc de la chimie de greffage des molécules. Cela peut cependant être corrigé, comme l'ont montré des travaux internes au CEA Grenoble.

Trois différentes couches en Nitrure de Silicium ont été réalisées au CEA Grenoble par P. Pouteau et A. Bellemin-Comte par évaporation thermique et leurs propriétés optiques ont été caractérisées par ellipsométrie par le laboratoire DOPT/SIONA du CEA Grenoble. En effet, de nombreux paramètres peuvent modifier les propriétés optiques de ces couches (température, humidité, ...) c'est pourquoi une caractérisation de ces propriétés a été réalisée :

Epaisseur de la couche de Nitrure (en nm)	Indice de réfraction de la couche de Nitrure
65	1,95
200	2,2
377	1,95

Table 3.2 Epaisseurs et indices de réfraction (à la longueur d'onde 580 nm) des trois couches minces de Nitrure de Silicium testées. Ces épaisseurs et indices de réfraction ont été caractérisés par ellipsométrie au laboratoire DOPT/SIONA du CEA Grenoble par S. Garcia.

3.3.4.2. Collecte du signal de fluorescence dans le composant – analyse théorique

Nous allons à présent étudier l'effet de ces couches minces sur la collecte du signal de fluorescence dans la lame de verre. L'étude particulière du confinement de ce signal dans ces couches minces sera réalisée dans un prochain paragraphe.

Calcul de la densité de puissance émise

Afin d'étudier la collecte du signal de fluorescence par ces composants, calculons la densité de puissance émise par un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope dans l'espace et situé à $z_{\mu} = 0$ nm de la surface de ces lames.

Les lames réalisées par un échange d'ions sont modélisées en tenant compte du gradient d'indice créé lors de l'échange ionique. Pour cela, on considère un empilement de couches minces d'épaisseurs de 1 μm et dont l'indice de réfraction varie de la manière suivante :

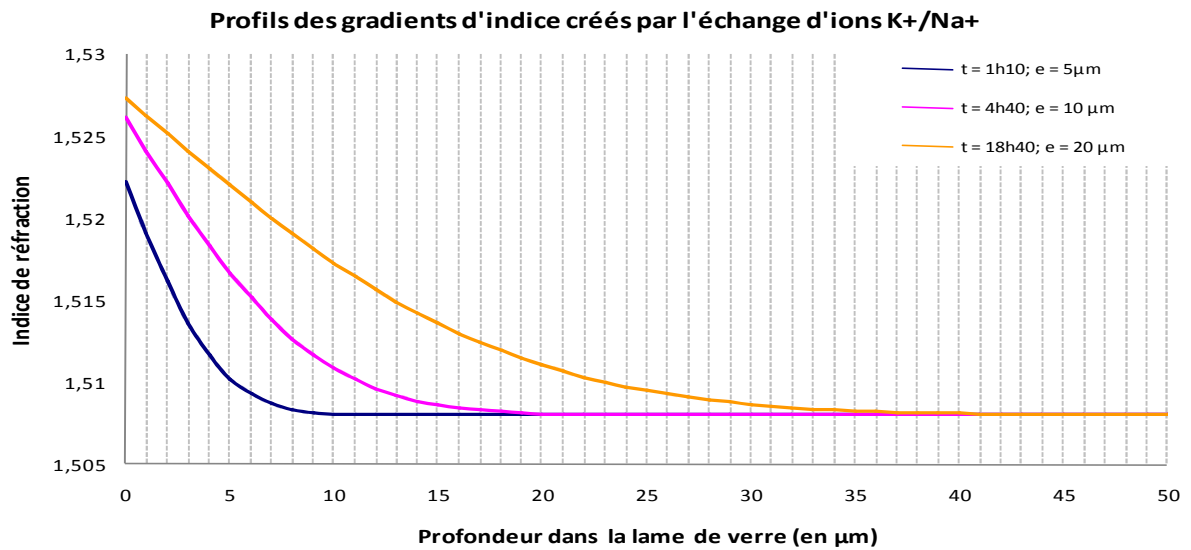


Figure 3.16. Profils des gradients d'indice de réfraction créés par l'échange d'ions K⁺/Na⁺ suivant les temps d'échange effectués. L'indice de la lame de verre utilisé pour l'échange ionique est de 1,508. Le quadrillage vertical représente les n couches minces de $1 \mu\text{m}$ d'épaisseur utilisées pour discrétiser ces gradients afin de les simuler dans nos codes de calcul. La valeur de l'indice de réfraction de chaque couche i est, quant à lui, définie comme étant la valeur du profil à la profondeur i en μm .

L'indice de réfraction des lames utilisées pour réaliser ces échanges d'ions est de 1,508.

Dans le cas des lames possédant une couche mince de Nitrure de Silicium, nous considérons, dans un premier temps, un indice de réfraction constant de 2,2 et les épaisseurs données dans la table 3.2. L'indice de réfraction du verre sur lequel sont déposées ces couches minces est de 1,51.

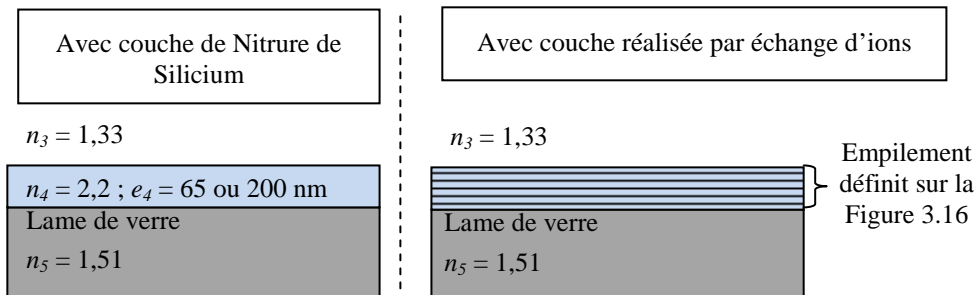


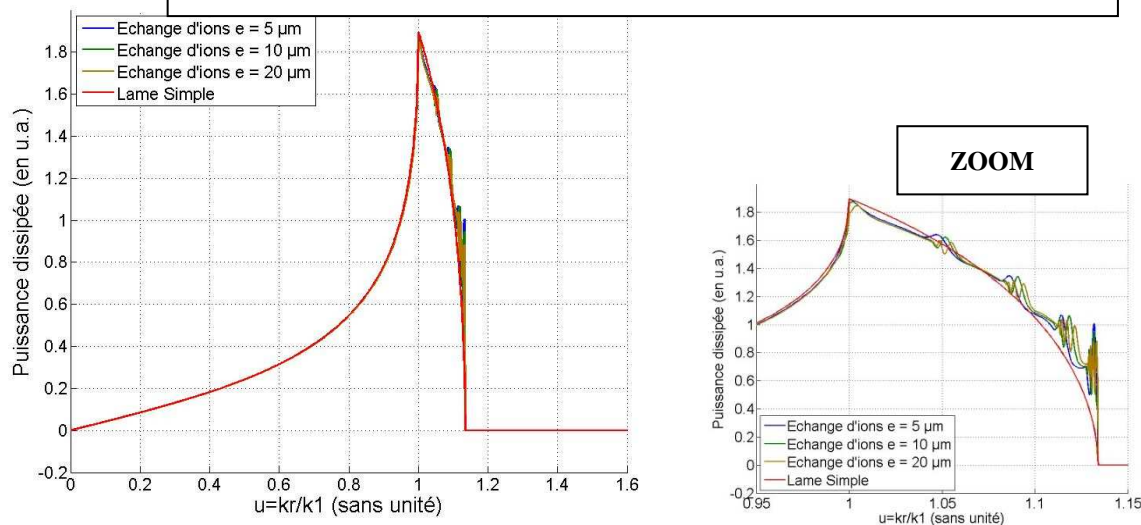
Figure 3.17. Schéma des structures que l'on a simulé pour l'étude théorique des effets d'une couche mince sur le couplage de la fluorescence dans la lame de verre.

Enfin, nous considérons que les dipôles sont situés dans un milieu aqueux d'indice de réfraction de $n_3 = 1,33$.

Le calcul du spectre de puissance dissipée par les dipôles sur ces différentes lames donne :

a

Spectre d'énergie dissipée par des dipôles à l'interface de lames possédant une couche mince créée par échange d'ions



b

Spectre d'énergie dissipée par des dipôles à l'interface de lames possédant une couche de Nitrure de Silicium

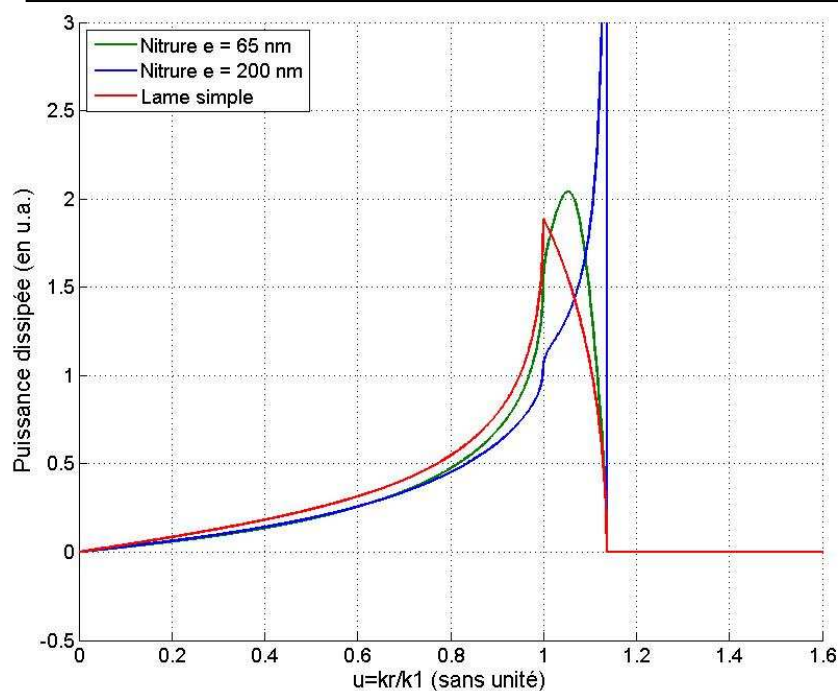


Figure 3.18. Calcul des spectres d'énergie dissipée par un ensemble de dipôles orientés de façon isotrope et situés à une altitude de 0 nm de a : une lame de verre d'indice de réfraction 1,508 possédant une couche mince créée par échange d'ions de 5, 10 ou 20 μm de profondeur (suivant le profil représenté sur la Figure 3.16) ou b : une lame de verre possédant une couche de Nitrure de Silicium de 65 ou 200 nm d'épaisseur à sa surface. Les courbes rouges sur ces deux graphiques représentent la densité d'énergie dissipée par ces mêmes dipôles situés à l'interface d'une lame de verre standard de microscope d'indice de réfraction 1,51 et utilisée actuellement dans le prototype que développé au laboratoire. La courbe b a été tronquée en hauteur par souci de lisibilité de la figure.

Tout d'abord, on remarque qu'une couche mince créée par échange d'ions modifie très faiblement la répartition de l'énergie dissipée par les dipôles par rapport à une lame simple. Par contre, une couche de Nitrure modifie

fortement cette répartition d'énergie. Cela est dû à la plus forte différence d'indice de réfraction induite par les couches de Nitrure par rapport aux couches créées par échanges d'ions.

Par ailleurs, on observe sur ces spectres de puissance dissipée la présence de résonances lorsque la lame de verre possède une couche mince à sa surface. On compte ainsi 4 à 5 résonances dans le cas des couches créées par échange d'ions et 1 résonance pour les couches de Nitrure. Ces résonances sont représentées sur la Figure 3.18 par des oscillations de la fonction $dP/du(u)$ sur le domaine des modes de substrat ($1 \leq u \leq n_5/n_3$). Ces résonances, qui sont aussi appelées "modes à fuites" correspondent en fait à des modes, c'est-à-dire ici à des directions d'émission dans la lame, qui entrent en quasi-résonance dans la couche mince mais dont une partie de l'énergie fuit dans la lame de verre (voir Figure 3.19). Si on considère que la couche mince entourée des milieux 1 et 3 forme une cavité Fabry Péroต์ dont un de ces miroirs est parfait (interface entre les milieux 1 et 2 car l'onde est piégée par réflexion totale à l'intérieur de la lame de verre) et l'autre semi réfléchissant, ces résonances correspondent alors aux modes de la cavité. Suivant leur direction, les modes émis par le dipôle vont être favorisés ou annihilés. Cela est plus particulièrement visible sur la couche de Nitrure où la différence d'indice de réfraction est plus importante entre les milieux 2 et 3 entraînant des résonances plus fortes de la cavité que pour les couches minces créées par échange d'ions. Enfin, on note que le nombre de modes à fuites est directement lié à l'épaisseur de la couche mince, c'est-à-dire de la cavité Fabry Péroต์ ainsi créée. En effet, le nombre de modes d'une cavité Fabry Péroต์ dépend de son épaisseur : plus cette cavité est épaisse et plus un nombre important de modes sont favorisés (voir § 3.4.3.3).

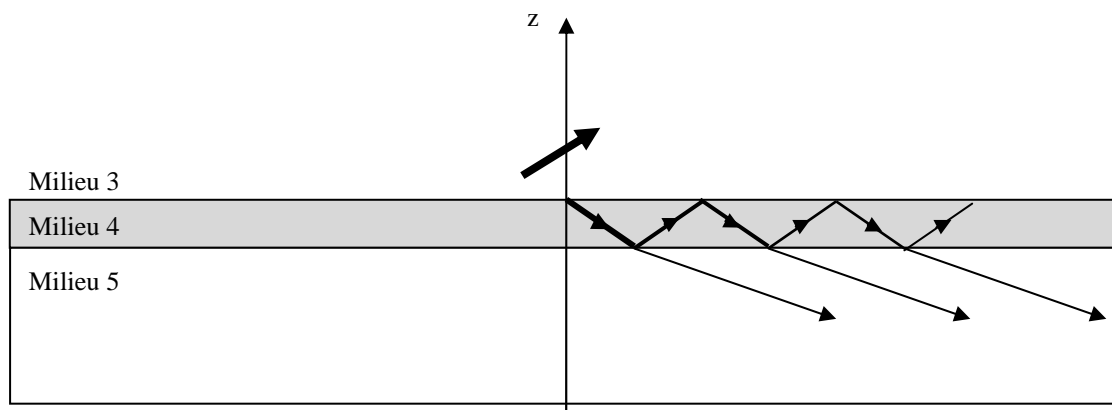


Figure 3.19. Illustration des modes à fuites dans le cas de l'émission d'un dipôle à l'interface d'une lame de verre (milieu 3) sur laquelle est déposée une couche de fort indice de réfraction (milieu 2). Les modes à fuites sont des modes en quasi résonance dans la couche mince mais dont une partie de l'énergie fuit dans la lame de verre.

Ce sont ces résonances qui vont permettre d'améliorer ou non le couplage du signal des dipôles dans la lame. Les résonances créées par une couche de Nitrure étant plus importantes que celles créées par une couche réalisée par échange d'ions, l'effet d'une couche de Nitrure sera plus important que celui d'une couche créée par échange d'ions.

Ces résonances expliquent par ailleurs l'allure de la Figure 2.37 dont les oscillations correspondent à ces modes dans le domaine $n_3/n_3 < u < n_5/n_3$ ($\approx 1,1$) et aux interférences entre le champ émis directement et le champ réfléchi dans le domaine $0 < u < n_3/n_3$.

Remarque : on peut aussi considérer ces modes à fuites comme étant des quasis modes guidés : si la résonance

était parfaite (c'est-à-dire s'il n'y avait pas de fuites dans la lame de verre) alors le mode serait entièrement confiné dans la couche mince et ce serait un mode guidé.

Comparaison par rapport à une lame simple

Comparons, à présent, la quantité de signal couplé dans ces composants par rapport au signal couplé dans une simple lame de verre. Pour cela, nous intégrons ces densités de puissance dans les différents domaines d'émission des dipôles (modes radiatifs, modes sur-critiques et modes guidés) que nous comparons à la quantité d'énergie couplée dans une lame simple.

Dans le cas d'une couche mince de Nitrure de Silicium dont l'indice réfraction n_4 est de 2,2 on trouve les rapports suivants :

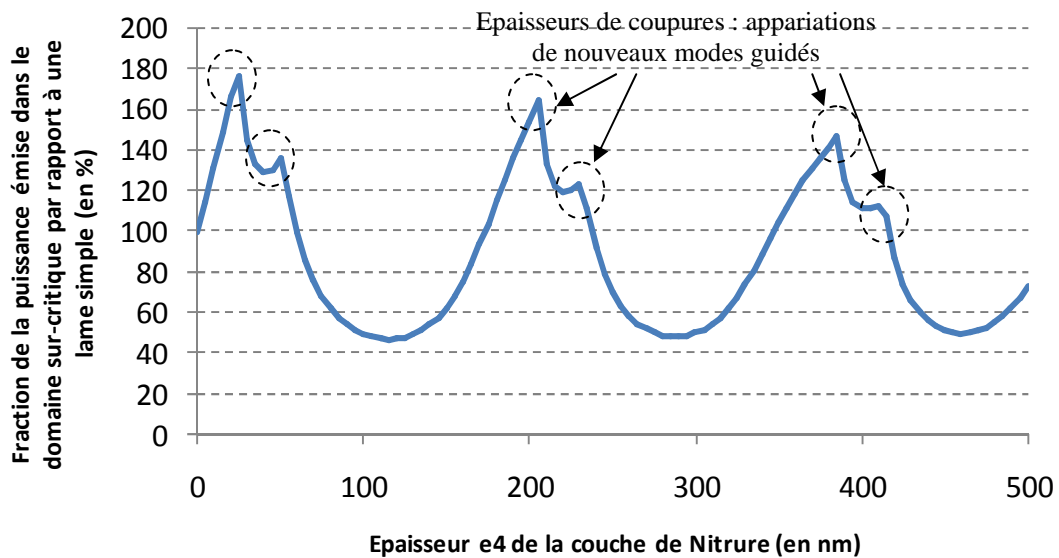


Figure 3.20. Fraction de la puissance émise dans le composant par rapport à une lame simple en fonction de l'épaisseur de la couche de Nitrure d'indice de réfraction 2,2. Les cercles en pointillés représentent les épaisseurs de coupures pour lesquelles il y a apparition d'un nouveau mode guidé dans la couche mince de Nitrure de Silicium.

On remarque que suivant l'épaisseur de la couche de Nitrure, la quantité de signal couplée dans la lame de verre sera plus ou moins importante. En effet suivant l'épaisseur optique de la couche les résonances des modes à fuites seront plus ou moins importantes, et le couplage dans la lame plus ou moins efficace.

On observe, d'autre part, des singularités sur cette courbe. Ces singularités, indiquées par les cercles en pointillés sur la Figure 3.20, sont en fait dues à l'apparition de nouveaux modes guidés dans la couche de Nitrure de Silicium. En effet, plus la couche de Nitrure est épaisse, et plus elle pourra supporter un nombre important de modes guidés. On observe donc les épaisseurs limites pour lesquelles il y a apparition d'un nouveau mode guidé dans la couche mince.

On remarque, par ailleurs, après chaque épaisseur de coupure une baisse du signal couplé dans les modes de substrat. On peut alors penser que la différence d'énergie est couplée dans les modes guidés. De plus, on observe une hausse de la puissance couplée dans les modes de substrat avant chaque épaisseur de coupure. Cela s'explique par le fait que plus l'épaisseur du guide augmente et plus les modes guidés déjà présents dans le guide sont confinés à l'intérieur de ce dernier, d'où un plus faible couplage de l'énergie des dipôles dans les modes

guidés (voir Figure 2.39). Suivant l'épaisseur de la couche de Nitrure, il semble donc possible d'optimiser la puissance émise dans les modes guidés au détriment de celle émise dans les modes de substrat et inversement. Cependant, nous ne pouvons pas non plus considérer que les variations de signal dans les modes sur-critiques proviennent uniquement du couplage plus ou moins important dans les modes guidés. En effet, les résonances et antirésonances des modes à fuite induites par la couche de Nitrure (voir Figure 3.19) expliquent aussi en partie ces variations.

Par ailleurs, l'indice de réfraction d'une couche de Nitrure de Silicium dépend de nombreux paramètres (température, humidité, ...) et peut fortement varier d'une réalisation à l'autre. Nous allons donc maintenant voir l'influence de l'épaisseur optique (produit de l'indice de réfraction avec l'épaisseur) de la couche de Nitrure sur le couplage du signal dans la lame. Pour cela, nous calculons la fraction d'énergie couplée dans une lame recouverte par une couche de Nitrure de Silicium dont l'indice de réfraction n_4 varie de 1,9 à 2,3 et dont l'épaisseur e_4 varie de 0 à 500 nm.

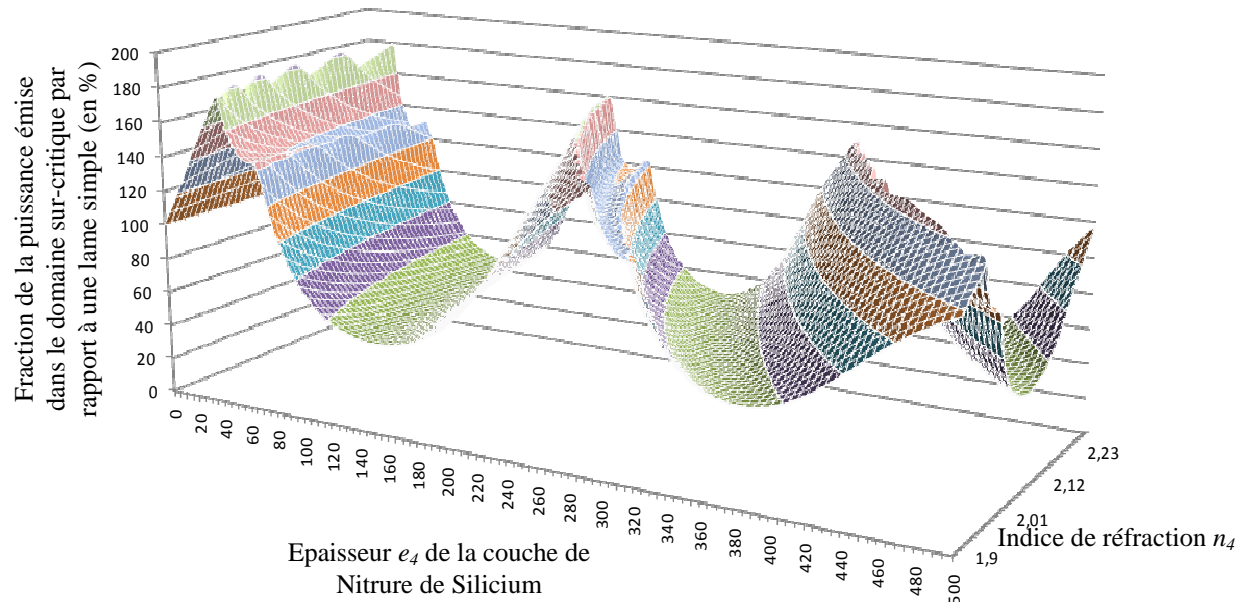


Figure 3.21. Fraction de la puissance émise dans le domaine sur-critique par un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope et situés à l'altitude $z_\mu = 0$ nm par rapport à l'énergie couplée dans le domaine sur-critique d'une simple lame de verre.

On remarque alors que, suivant l'épaisseur optique $e_4 n_4$ de la couche mince, cette dernière peut permettre d'améliorer ou non la quantité de signal couplée dans le composant. Ces paramètres sont donc critiques pour utiliser une telle couche d'indice afin d'améliorer les performances de notre instrument.

Par exemple, pour un indice de réfraction de 2,2, une erreur de 10 % sur l'épaisseur de 200 nm de la couche de Nitrure peut entraîner soit une baisse du couplage dans la lame de verre de 2 % soit un gain de 154 % par rapport au signal couplé dans une lame simple. Inversement, pour une épaisseur fixée à 200 nm, une erreur de 10 % sur l'indice de réfraction de 2,2 de la couche de Nitrure peut causer une baisse de 10 % ou un gain de 154 % du signal couplé dans la lame par rapport à une lame simple. Toutefois, il est possible de minimiser ces erreurs en choisissant une épaisseur pour laquelle les variations d'indice influent peu sur la quantité de signal couplée dans la lame. Pour une épaisseur de l'ordre de 50 nm, les incertitudes sur e_4 et n_4 sont par exemple moins critiques que

pour des épaisseurs plus grandes.

Il sera donc nécessaire de contrôler finement ces paramètres afin d'avoir l'effet désiré.

Dans le cas des couches minces réalisées par un échange d'ions, le très faible écart d'indice de la couche mince ne permet pas d'améliorer significativement le signal couplé dans la lame. On calcule en effet, que les trois composants réalisés par l'IMEP doivent améliorer la quantité de signal couplée dans le composant seulement d'un facteur de 1,01 à 1,02 suivant l'épaisseur de la couche. Ces couches ne doivent donc pas permettre d'améliorer les performances de l'instrument développé au laboratoire.

Réduction du volume de mesure

Enfin, regardons l'effet de ces couches minces de fort indice de réfraction sur le volume de mesure, c'est-à-dire sur la discrimination des signaux de volume vis-à-vis des signaux de surface.

Pour cela, nous calculons la puissance émise dans le domaine sur-critique pour différentes altitudes z_μ de dipôles à l'aide du calcul du spectre de puissance dissipée par ces dipôles. Ces calculs sont réalisés pour une lame simple, les lames possédant une couche de Nitrure décrites dans la table 3.2 et les lames possédant une couche mince réalisée par échange d'ions, cette couche étant modélisée par un empilement de couches minces (voir Figure 3.16).

Dans le cas des lames possédant une couche mince réalisée par échange d'ions, nous observons la même dépendance du couplage du signal des dipôles avec z_μ que pour une lame simple. En effet, le faible écart d'indice de ces couches fait que leurs effets sont très faibles. Ces couches minces ne doivent donc pas permettre de modifier significativement les propriétés de collecte du signal de fluorescence dans le composant.

Dans le cas des couches de Nitrure, nous calculons :

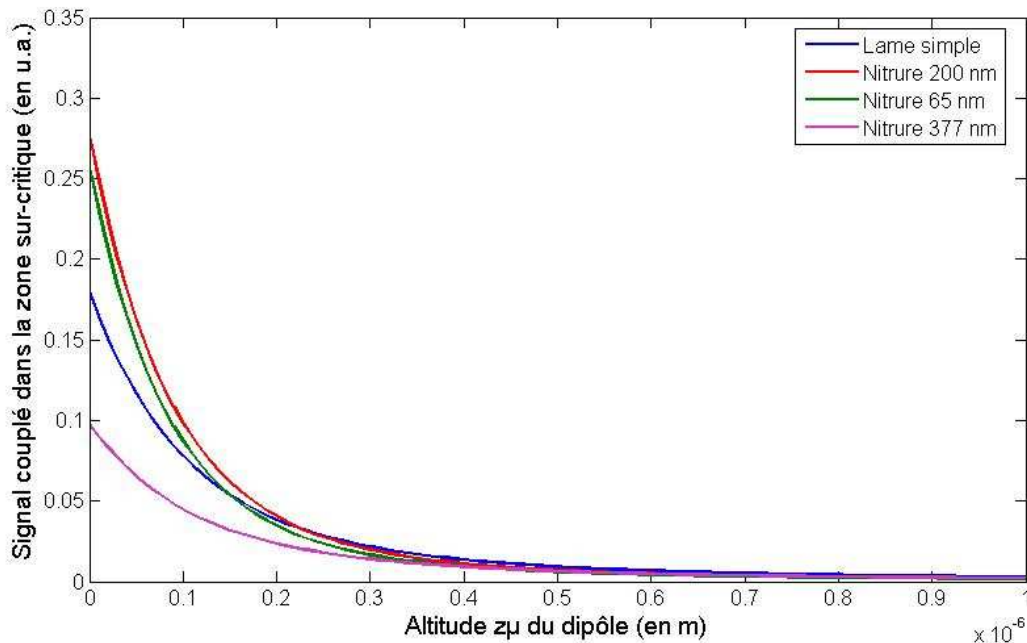


Figure 3.22. Calcul de la puissance couplée dans la zone sur-critique du composant en fonction de l'altitude z_μ des dipôles. Ces calculs sont réalisés pour un ensemble de dipôles orientés de manière isotrope dans l'espace et émettant à 580 nm.

On remarque donc que suivant l'épaisseur optique de la couche de Nitrure, la dépendance du couplage dans la

lame avec l'altitude z_μ des dipôles varie. Ainsi, pour les épaisseurs optiques pour lesquelles nous avons calculé une augmentation du couplage dans le composant, c'est-à-dire pour les couches de Nitrure de 65 et 200 nm, nous observons une réduction du volume de mesure qui se traduit par une dépendance en z_μ plus importante. Par contre pour la couche de 377 nm pour laquelle nous avons calculé une baisse du couplage dans la lame par rapport à une lame simple (voir Figure 3.21), on observe une dépendance plus faible avec z_μ du couplage dans la lame. L'épaisseur optique de la couche mince est donc encore un paramètre critique vis-à-vis de la dépendance en z_μ du couplage de la fluorescence dans la lame. Cela provient du fait que cette épaisseur optique de cavité ne permet pas de renforcer les modes à fuite mais au contraire les annihiles.

3.3.4.3. Collecte du signal de fluorescence dans le composant – caractérisation expérimentale

Nous allons à présent décrire les expériences que nous avons réalisées afin de valider les effets d'une couche mince de fort indice de réfraction sur la collecte du signal de fluorescence dans la lame que nous avons mis en évidence théoriquement. Pour cela, deux types d'expériences ont été réalisés :

- des expériences à sec réalisées sur le banc microscope (voir § 3.2.2)
- des expériences d'hybridation de brin ADN réalisées sur le prototype complet développé au laboratoire.

Expérience à sec

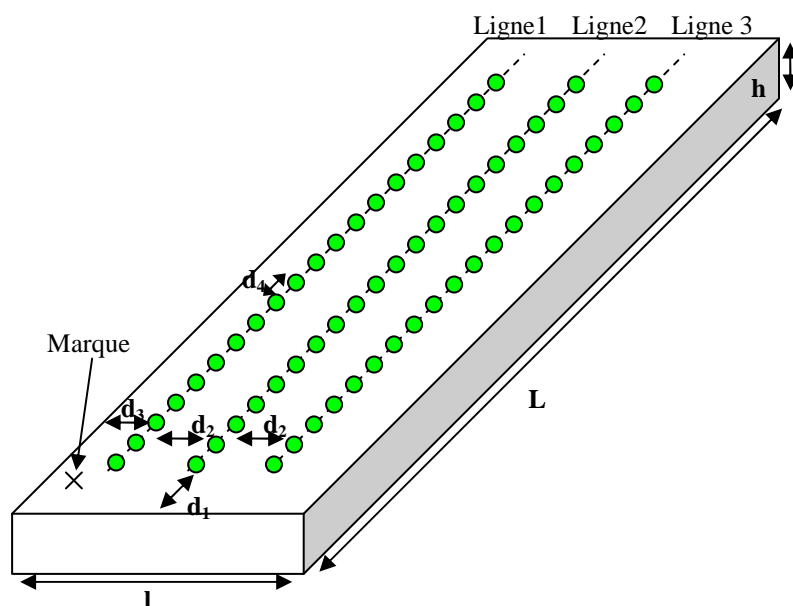
Les expériences à sec réalisées sur le banc microscope ont été mises au point afin de simplifier le protocole expérimental. Au lieu de réaliser des réactions d'hybridation demandant une fonctionnalisation chimique des lames et une gestion de composants fluidiques, ces expériences ont simplement nécessitées le dépôt par adsorption de plots fluorescents sur les composants à tester.

Nous avons donc déposé sur la surface de plusieurs lames possédant ou non une couche mince des gouttes de solutions de brins d'ADN (oligonucléotides d'environ 15 mères) préalablement marqués par des fluorophores organiques Cy3 (Amerchan).

Le dépôt de ces brins d'ADN est fait par adsorption sur la lame de verre préalablement lavée afin de simplifier le dépôt des molécules biologiques par rapport à l'utilisation d'une chimie de greffage plus lourde à réaliser. Cette méthode ne modifie pas les propriétés optiques de la couche mince (pas d'attaque chimique). Le dépôt a été réalisé de la manière suivante en salle blanche :

- dépôt d'une goutte d'oligomères dans une solution tampon sur la lame à l'aide d'un robot de spotting,
- séchage rapide de la solution tampon par simple évaporation. Les oligomères marqués Cy3 se retrouvent alors adsorbés à la surface de la lame de verre.

Le robot a ainsi déposé trois lignes de 20 plots d'oligomères de 500 μm de diamètre environ suivant le plan de dépôt suivant :



- $d_1 = 10 \text{ mm}$,
- $d_2 = 5 \text{ mm}$,
- $d_3 = 7,5 \text{ mm}$
- $d_4 = 1 \text{ mm}$
- Une marque indique la face sur laquelle sont déposés les plots ainsi que la face de sortie à partir de laquelle la position des plots a été mesurée,
- La concentration en oligomères de chacun des plots est de $10 \mu\text{M}^1$.

Figure 3.23. Plan de dépôt des gouttes d'oligomères sur les lames de verres à tester.

Trois types de lames ont été testés :

- des lames de microscope (verre standard) d'indice de réfraction 1,51 dont les bords n'ont pas été polis,
- des lames de verre d'indice de réfraction 1,51 recouvertes par une couche de Nitrure de Silicium et dont les bords n'ont pas été polis. Les épaisseurs et indices de réfraction de ces couches sont donnés dans la table 3.2,
- des lames de verre d'indice de réfraction $n_s \approx 1,508$ recouvertes par une couche mince réalisée par une technique d'échange d'ions. Les épaisseurs de couches de 5, 10 et 20 μm ont été testées. Les bords des lames ont aussi été laissés bruts.

Le protocole de mesure suivi pour chaque plot fluorescent est décrit dans l'Annexe A.1.3.

Si on compare le signal en bout de lame de chaque plot fluorescent i par rapport au signal en bout de lame simple non polie du plot fluorescent i (c'est-à-dire à la même position relative sur la lame), on aboutit au résultat suivant :

¹ 1 Molaire (1 M) représente une concentration de 1 mole par litre.

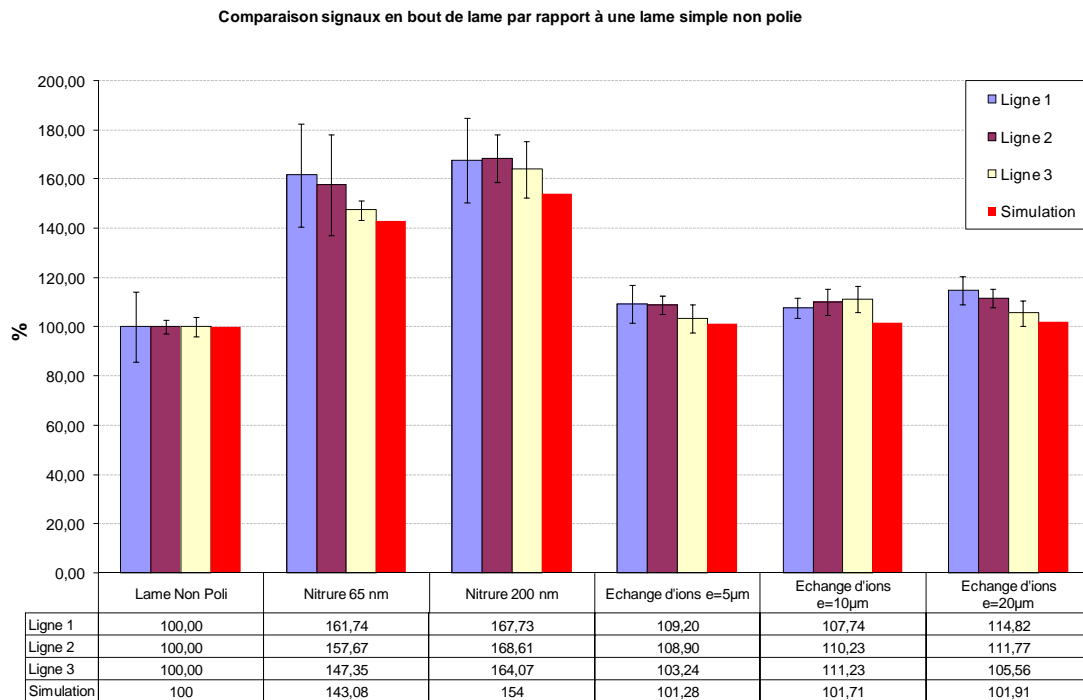


Figure 3.24. Comparaison des signaux collectés en bout de lame en fonction du type de lame testé par rapport au signal détecté en bout d'une lame simple de microscope. Les barres d'erreurs tracées sur cette figure représentent les incertitudes sur la moyenne du gain pour les 20 plots de chaque ligne déposés sur les lames (voir Figure 3.23). En rouge sont représentés les gains pour ces différentes lames calculés à partir des modèles théoriques et présentés au paragraphe précédent.

Ces mesures nous permettent donc de confirmer que :

- les couches minces réalisées par échange d'ions ne permettent pas d'augmenter significativement le signal couplé dans la lame par rapport à une lame simple. L'écart d'indice de réfraction entre ces couches minces et le verre de la lame est trop faible pour cela,
- les lames présentant une couche mince de Nitrure de 65 et 200 nm permettent d'augmenter d'un facteur 1,5 à 1,7 le signal collecté dans le composant. En effet, l'épaisseur optique de ces couches permet une telle augmentation comme le montrent les calculs théoriques (voir Figure 3.21).

On remarque de plus que :

- la simulation sous-estime systématiquement la quantité de signal émise dans la zone sur-critique quel que soit le type de couche mince considérée. Cette sous-estimation est de faible amplitude,
- la correspondance entre la simulation et les données expérimentales est bonne. En effet, malgré la sous-estimation des simulations, on retrouve les mêmes tendances suivant l'épaisseur optique de la couche considérée. De plus, on mesure que la couche de 200 nm de Nitrure permet de collecter en moyenne 107 % plus de fluorescence dans la lame que la couche de 65 nm, comme le prédit la simulation.

La sous-estimation de la quantité de signal émise dans la zone sur-critique pourrait s'expliquer par le fait que l'on ne prend pas en compte dans nos calculs la quantité de signal qui est couplée dans les modes guidés supportés par les différentes couches minces. En effet, la méthode de mesure permet de collecter aussi bien les modes de substrat que les modes guidés dans les couches minces. Par contre, le modèle théorique utilisé ici nous

permet d'avoir seulement une estimation de l'énergie couplée dans les modes guidés. Cependant, les calculs théoriques réalisés au chapitre 2 (§ 2.5.4) semblent indiquer que très peu d'énergie se couple dans les modes guidés de ce type de couches minces. Cela ne peut donc pas expliquer les différences observées ici.

Une autre possibilité pour expliquer cette différence est l'autofluorescence de la couche de Nitrure. En effet, il a été caractérisé qu'une couche de Nitrure émettait de la fluorescence lorsqu'elle est excitée dans le vert, ce qui est notre cas (Lehr 2003, Rachet 2007). Cette autofluorescence peut donc expliquer en partie la différence d'énergie entre les données expérimentales et les simulations. Afin de limiter cette autofluorescence, certains auteurs préfèrent utiliser une couche de Ta_2O_5 (Lehr 2003) car elle est moins autofluorescente et présente un indice de réfraction similaire au Nitrure. Cependant, les procédures de greffage de molécules biologiques sur Ta_2O_5 ne sont moins maîtrisées au laboratoire que celles sur Si_3N_4 et nous avons préféré conserver le Nitrure pour nos expériences.

Enfin, les incertitudes sur les valeurs exactes des épaisseurs et indices de réfraction des couches minces peuvent aussi expliquer les différences observées entre les données expérimentales et les simulations.

En première conclusion de ces expériences et de ces simulations, nous pouvons donc confirmer le fait qu'il est nécessaire d'avoir un contraste d'indice de réfraction important entre le milieu extérieur et la lame afin de pouvoir collecter un maximum d'énergie dans la lame.

Dans la suite de nos expériences, nous n'utiliserons donc plus que les lames avec une couche de Nitrure de Silicium, car les couches créées par échanges d'ions ne permettent pas d'améliorer significativement la quantité de signal couplée dans la lame de verre.

Expérience d'hybridation

Afin d'étudier les effets d'une couche mince sur la collecte du signal dans la lame, nous avons aussi réalisé des expériences d'hybridation de brins d'ADN sur le prototype complet développé au laboratoire.

Le protocole expérimental est le même que celui présenté au paragraphe 3.3.2.2.

Lorsque l'on compare les résultats obtenus sur une simple lame de verre et ceux obtenus à l'aide d'une lame recouverte par une couche de Nitrure de 200 nm on trouve :

Comparaison des signaux détectés en bout de lame

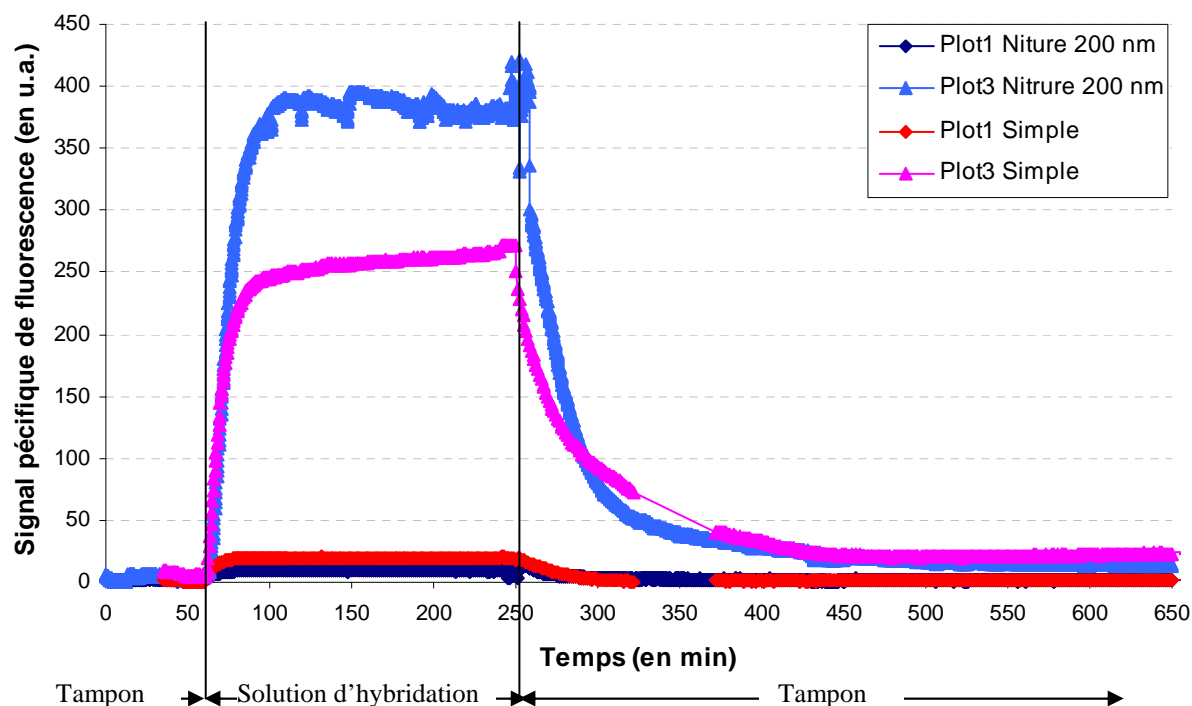


Figure 3.25. Comparaison des signaux détectés en bout d'une lame simple ou d'une lame possédant une couche de Nitrure de 200 nm d'épaisseur à sa surface pour une solution d'hybridation de concentration 10 nM. Par souci de clarté, seuls un plot spécifique et un plot non spécifique ont été.

On remarque à nouveau que :

- une lame possédant une couche de 200 nm d'épaisseur de Nitrure à sa surface permet bien de collecter 1,5 fois plus de signal fluorescent des plots spécifiques (c'est-à-dire des plots 3 sur la Figure 3.25) qu'une lame simple sans couche mince,
- une lame possédant une couche de 200 nm d'épaisseur de Nitrure à sa surface collecte deux fois moins de signal de volume (signal issu des plots non spécifiques, c'est-à-dire des plots 1) qu'une lame simple.

Ce dernier point provient du fait qu'une telle couche de Nitrure permet de réduire le volume de mesure par rapport à celui d'une lame simple (voir Figure 3.22). Cependant, on mesure une diminution plus importante du signal de volume que ce que l'on peut prédire à l'aide des simulations (intégrales des courbes de la Figure 3.22). Cette baisse d'offset observée expérimentalement doit donc être confirmée par d'autres mesures et pourrait provenir d'adsorption non spécifique plus importante sur le verre que sur une couche de Nitrure (Rachet 2007).

Cette augmentation du signal spécifique et cette diminution du signal d'offset permet, toutefois, **d'améliorer le rapport signal sur bruit**, défini par le rapport entre le signal spécifique détecté et trois fois la racine carré du signal d'offset (cas d'un bruit "Poissonien"), **d'un facteur d'environ deux**.

Enfin, lorsque l'on compare les cinétiques d'association mesurées sur ces deux lames différentes, nous remarquons que cette cinétique n'est pas complètement terminée sur la lame simple alors qu'elle semble finie sur la lame possédant une couche de Nitrure. Cela peut provenir d'une densité de sondes de capture moins importante sur la lame Nitrure que sur la lame simple. En effet, la chimie de greffage utilisée n'étant pas

optimisée pour le Nitrure, il se peut que la quantité de sondes de capture ayant été greffées sur sa surface soit moins importante que celle ayant été greffée sur la simple lame de verre. Dans ce cas, la saturation des sondes de capture, c'est-à-dire la fin de la cinétique d'association, est atteinte plus rapidement sur la lame Nitrure que sur la lame simple. Une densité de sondes plus grande pour la lame de Nitrure doit donc permettre d'augmenter encore le signal en bout de lame.

Lorsque l'on compare cette fois-ci le signal en bout d'une lame simple et de la lame recouverte par une couche de Nitrure de 377 nm d'épaisseur, les résultats sont les suivants (la concentration de la solution d'hybridation est ici de 80 nM et pas 10 nM comme précédemment, le signal attendu est donc plus important) :

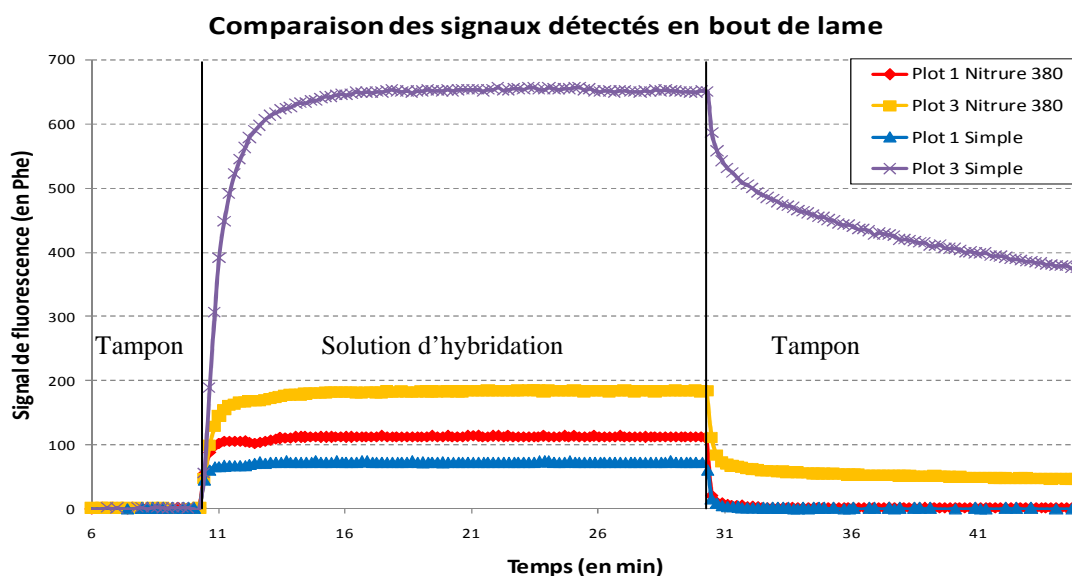


Figure 3.26. Comparaison des signaux détectés en bout d'une lame simple ou d'une lame possédant une couche de Nitrure de 377 nm d'épaisseur à sa surface pour une solution d'hybridation de concentration 80 nM. Par souci de clarté, seuls un plot spécifique et un plot non spécifique ont été représentés.

On remarque cette fois ci un signal spécifique plus important en sortie de lame simple qu'en sortie de la lame possédant une couche de 377 nm de Nitrure et inversement un signal d'offset plus important en sortie de la lame Nitrure. Ceci est bien conforme à nos simulations :

- on calcule qu'une telle couche de Nitrure entraîne une perte de l'ordre de 50 % du signal par rapport à une lame simple, et on mesure ici une perte d'environ 70 %. La différence peut provenir de la différence de densité de sonde de capture sur ces deux lames,
- le calcul montre une moins bonne discrimination du signal de volume par une couche de 377 nm de Nitrure ce que l'on retrouve sur l'expérience où le signal d'offset de la lame Nitrure est 1,5 fois plus important que celui d'une lame simple (voir Figure 3.22).

Des expériences sont prévues prochainement afin de confirmer ces résultats et déterminer la densité de sondes de captures greffées sur ces deux types de lames qui pourrait expliquer la différence de signal mesurée en bout de lame.

3.3.4.4. Confinement du signal dans la couche mince

Nous avons pour l'instant étudié le couplage global du signal de fluorescence dans la lame de verre. Cependant aucune des expériences réalisées ne nous a permis de quantifier la quantité de signal qui est couplée et confinée dans la couche mince de fort indice de réfraction par rapport au signal se propageant dans l'ensemble de la lame.

Par ailleurs, les calculs réalisés au chapitre 2 semblent montrer que très peu d'énergie peut se coupler, et donc être confinée, dans ces type de couches minces. Nous allons confirmer ce fait par des calculs adaptés aux lames de Nitrure dont nous disposons.

Nous présenterons ensuite les expériences en champ proche que nous avons réalisées afin de déterminer la répartition de l'énergie dans la lame et donc le taux de confinement dans la couche mince.

Simulation

Si on calcule l'intégrale de recouvrement (voir § 2.5.4) entre le profil des modes guidés à l'intérieur de couches de Nitrure de 50, 200 ou 400 nm et les champs évanescents de dipôles situés à la surface de ces lames on trouve :

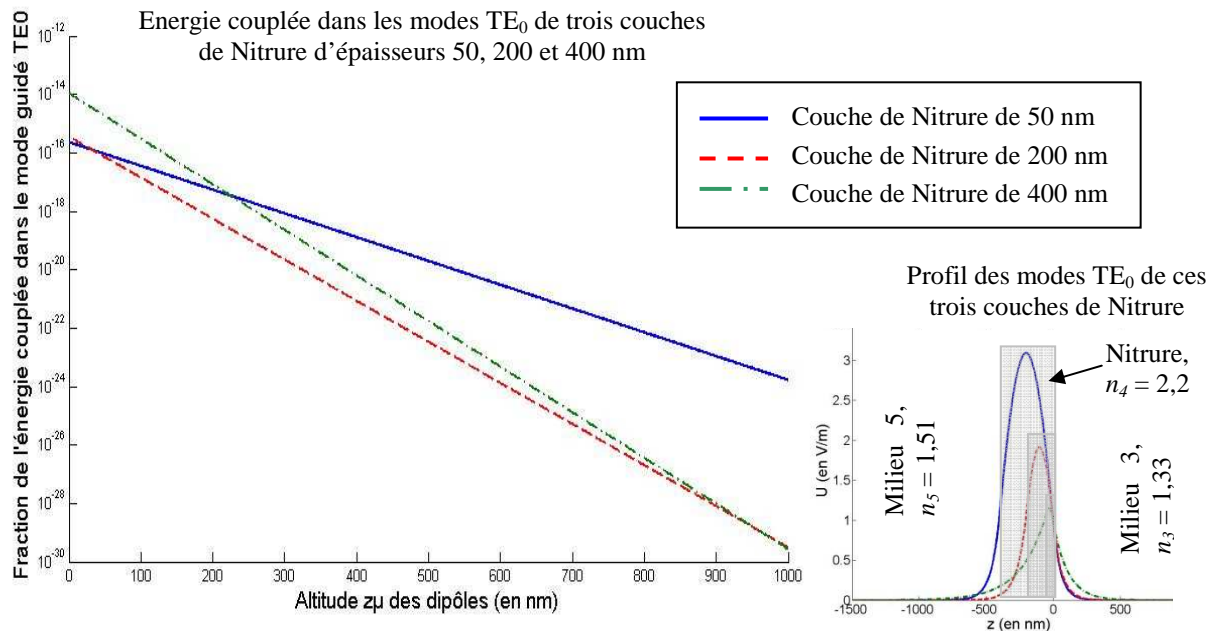


Figure 3.27. Fraction de l'énergie émise par un ensemble de dipôles orientés aléatoirement et couplée dans les modes guidés TE_0 confinés dans une couche de Nitrure de 50, 200 et 400 nm d'épaisseur en fonction de l'altitude de ces dipôles. Représentation en échelle semi logarithmique. Le graphique en bas à droite représente le profil des trois modes guidés TE_0 pour chacune de ces épaisseurs.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- on retrouve le caractère évanescents du couplage de l'énergie du dipôle dans les modes guidés (droite en échelle semi logarithmique),
- suivant l'épaisseur de la couche, plus ou moins d'énergie pourra être couplée dans les modes guidés. On remarque ainsi qu'une couche de 50 nm de Nitrure permet de coupler plus d'énergie qu'une couche de 200 nm d'épaisseur. Cela vient du fait que le mode TE_0 dans une couche de 50 nm de Nitrure possède une queue évanescents plus importante dans le milieu du dipôle (milieu 1) que le mode TE_0 d'une couche de Nitrure de 200 nm d'épaisseur (voir Figure 3.27 en bas à droite),

- on remarque, à nouveau, que très peu d'énergie peut être couplée dans les modes guidés de ce type de structure.

Afin de confirmer ces calculs, ou tout du moins le fait que très peu de signal de fluorescence est couplé et confiné dans la couche mince, nous allons maintenant présenter les expériences en champ proche que nous avons réalisées.

Expérience en champ proche

Nous avons caractérisé les lames suivantes sur le banc en champ proche (voir § 3.2.3) :

- une lame simple d'épaisseur de 0,75 mm, dont les bords ne sont pas polis,
- une lame de verre de 0,75 mm d'épaisseur recouverte par une couche de Nitrure de Silicium de 377 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction de 1,95,
- une lame de verre de 0,5 mm d'épaisseur recouverte par une couche de Nitrure de Silicium de 65 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction de 1,95.

Les plots fluorescents utilisés ici sont des plots réalisés à l'aide d'encre fluorescente déposée avec une pointe d'un feutre dont le spectre d'émission se situe dans le domaine d'émission du fluorophore Cy3. L'utilisation de tels plots fluorescents permet, d'une part, de simplifier les étapes de préparation des lames car il n'est pas nécessaire de les fonctionnaliser et, d'autre part, de créer des plots fluorescents nettement plus intenses que des plots biologiques après association des molécules cibles. Enfin, les fluorophores inclus dans ces encres ont une photo résistance permettant de réaliser des mesures de longues durées contrairement aux fluorophores organiques.

Pour chacune des lames nous avons réalisé entre 3 et 8 séquences de mesure de la tranche de la lame avec un pas de 10 μm , valeur fixée par le diamètre de 8 μm de la fibre utilisée, afin de pouvoir réaliser des calculs d'incertitudes sur nos mesures.

Enfin, nous avons positionné les plots fluorescents le plus loin possible de la face de sortie de la lame de verre afin de considérer que la répartition de l'énergie suivant la tranche de la lame est la même quel que soit la position de la fibre selon l'axe (Oy) (voir Figure 3.28)

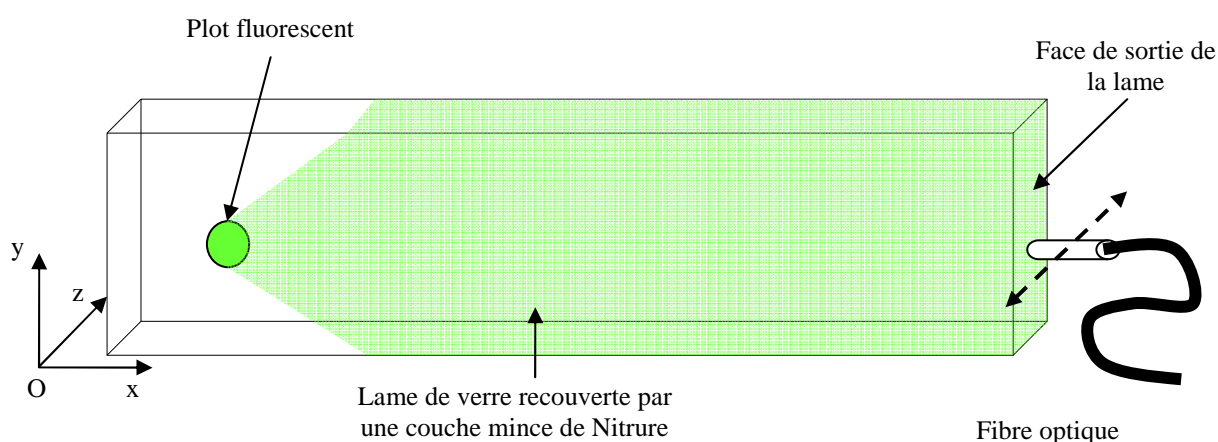
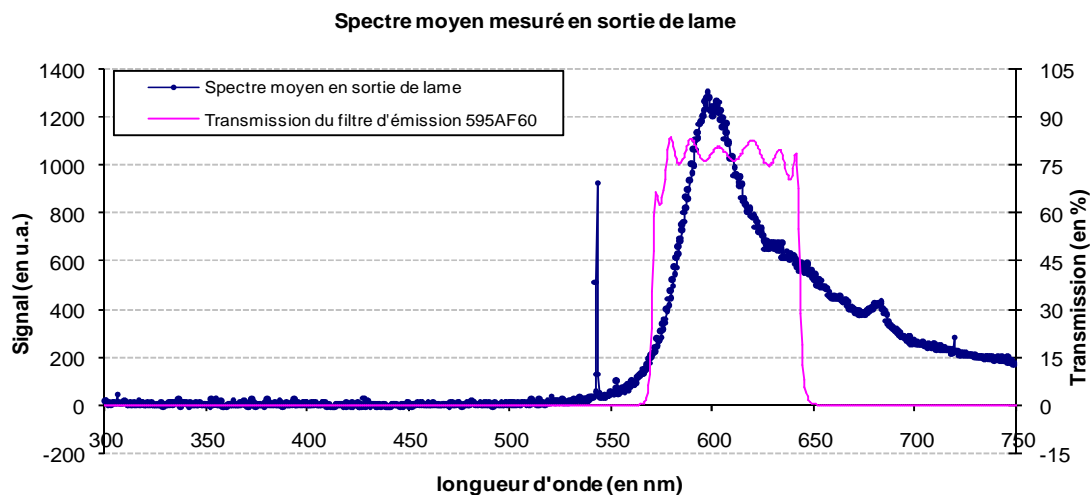


Figure 3.28. Représentation 3D de la lame de verre de la position de la fibre optique en bout de lame et de sa direction de balayage de la face de sortie de la lame de verre suivant l'axe (Oz).

L'intégration pour chaque position de la fibre des spectres mesurés en bout de lame dans le domaine de transmission du filtre utilisé en émission nous permet de remonter à la répartition de l'énergie suivant la largeur de la lame :

(a)



(b)

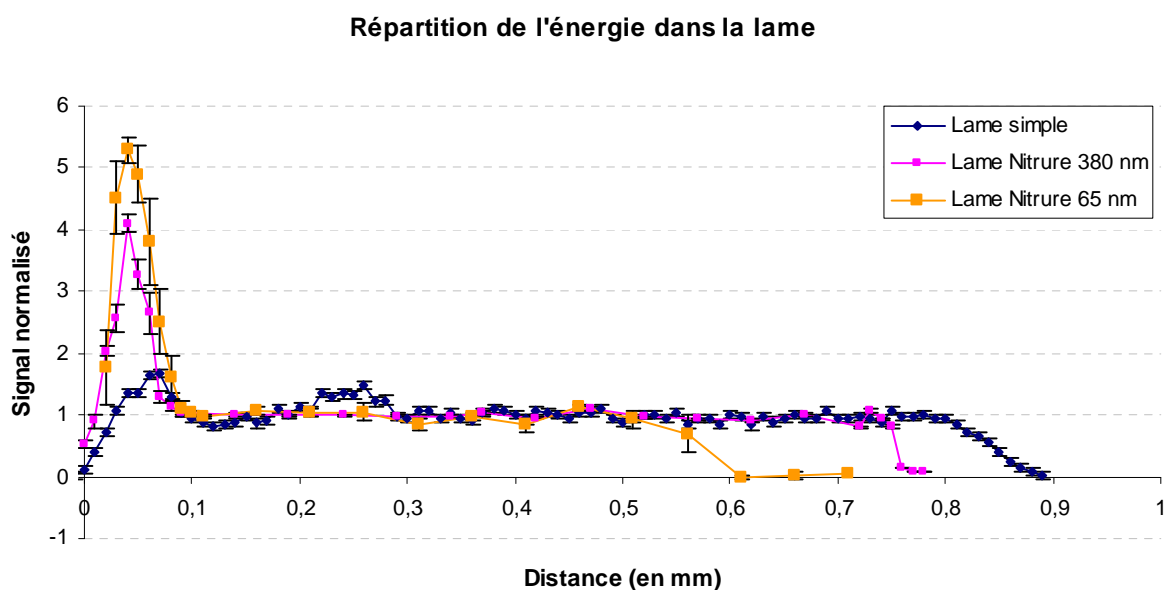


Figure 3.29. (a) Spectre moyen mesuré en sortie de la lame simple. La moyenne est effectuée sur l'ensemble des spectres mesurés lorsque la fibre est entièrement en face de la tranche de sortie de la lame de verre au niveau du verre et non de la couche de Nitrure. En rose est représentée la transmission du filtre d'émission utilisé dans l'instrument développé au laboratoire. (b) : Répartition de l'énergie à l'intérieur des trois lames testées. Chaque point correspond à l'intégration du spectre en sortie de lame sur le domaine spectral de transmission du filtre d'émission 595AF60 utilisé dans notre instrument. Les barres d'erreur correspondent aux incertitudes calculées pour l'acquisition respective de 3 et 8 spectres pour la lame simple et les lames avec couche de Nitrure et ce pour chaque position de la fibre. Ces répartitions d'énergie ont été normalisées par rapport au signal moyen collecté au niveau de la lame de verre (hors de la couche mince).

Tout d'abord, on remarque sur le spectre moyen mesuré en sortie de lame la présence d'un pic à 543 nm correspondant au signal d'excitation générée par la raie verte du laser He-Ne utilisé. On observe alors que très peu de signal d'excitation est couplé puis guidé dans la lame comparativement à la fluorescence collectée. En

effet, si on intègre le flux laser atteignant le détecteur et qu'on le compare à la fluorescence collectée intégrée sur le domaine du filtre d'émission utilisé dans notre instrument, on trouve un rapport d'environ 70. Cela confirme le fait que très peu de signal d'excitation peut être couplée dans la lame grâce à la configuration choisie : excitation normale à la lame et collection de la fluorescence dans la lame.

La mesure de la répartition d'énergie dans la lame permet, quant à elle, de retrouver l'épaisseur des lames testées. Lorsque la fibre est entièrement face à la lame, le signal mesuré est égal ou supérieur à 1 (suivant qu'elle se trouve face à la couche mince de Nitrure ou non). Les décroissances aux extrémités représentent les cas où la fibre n'est plus tout en fait en face de la lame mais collecte tout de même une partie du signal dans son cône d'acceptance défini par son ouverture numérique ($ON_{fibre} = 0,22$). Les différences de pentes de ces décroissances correspondent aux variations de la distance fibre – lame (voir Figure 3.31).

Ces répartition d'énergie ne nous permettent cependant pas d'accéder directement à l'énergie confinée dans la couche mince de Nitrure. En effet, la taille de la fibre étant supérieure à l'épaisseur de la couche de Nitrure, il est nécessaire d'appliquer une méthode de déconvolution afin de dissocier les signaux provenant de la couche mince de ceux guidés dans l'ensemble de la lame.

La méthode de déconvolution que nous avons utilisée est basée sur l'hypothèse que chaque point de la face de sortie de la lame peut être considéré comme une source ponctuelle isotrope émettant dans un cône d'émission défini par les ouvertures numériques en sortie de la lame de verre (ON_{verre}) ou en sortie de guide ($ON_{nitrure}$). Ainsi, lorsque la fibre se déplace le long de la lame, cette dernière collecte l'ensemble des rayons issus des sources compris dans son cône d'acceptance :

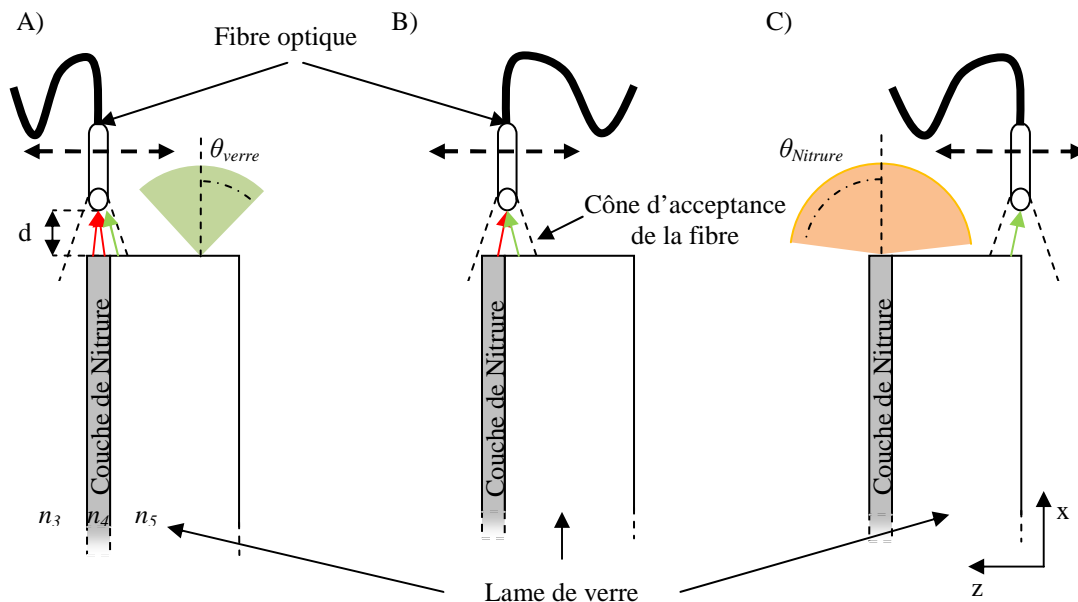


Figure 3.30. Représentation schématisée des rayons collectés par une fibre optique lors de son déplacement suivant la largeur de la face de sortie de la lame de verre. A : lorsque la fibre est exactement en face de la couche de Nitrure, elle collecte une majorité de rayons provenant uniquement de cette couche. B : lorsque la fibre est à cheval entre la couche mince et le verre, elle collecte des rayons provenant aussi bien de la lame de verre que de la couche mince. C : lorsque la fibre n'est plus parfaitement en face de la lame, elle collecte de moins en moins de rayons issus de la lame. Les quartiers de cercle en vert et en rouge représentent, quant à eux, les diagrammes d'émission des sources ponctuelles en sortie de lame et de couche mince respectivement. Leur ouverture est définie par les ouvertures numériques en sortie de verre et de couche mince.

On calcule (voir annexe A.2.3) que :

- l'angle solide d'émission en sortie d'une couche de Nitrure est de 2π sr,
- l'angle solide d'émission en sortie de la lame de verre est de 1,9 sr,
- l'angle solide d'acceptance de la fibre est de 0,12 sr.

Considérons à présent deux intensités lumineuses I_N et I_v suivant que les sources ponctuelles sont situées au niveau de la couche de Nitrure ou de la lame de verre. Si on intègre, pour chaque position de la fibre, l'ensemble des rayons issus de la lame de verre ayant une intensité I_v à l'intérieur du cône d'acceptance de la fibre ainsi que les rayons issus de la couche de Nitrure ayant une intensité I_N comprise aussi dans le cône d'acceptance de la fibre, on est alors capable de tracer la répartition théorique d'énergie le long de la face de sortie de la lame telle que vue par la fibre optique.

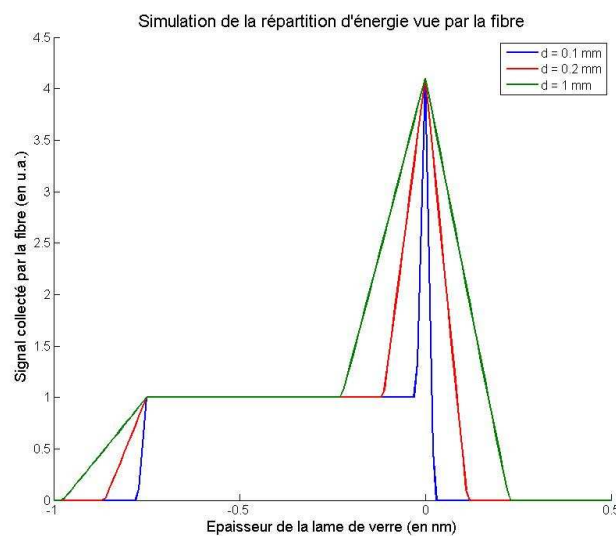


Figure 3.31. Simulation de la répartition d'énergie dans une lame de verre recouverte par une couche de Nitrure de 400 nm d'épaisseur vue par une fibre optique monomode à une distance $d = 0,1$; $0,5$ ou 1 mm de la face de sortie de la lame. Nous avons pris les valeurs $I_v = 4,5$ et $I_N = 14$ pour ces calculs.

On observe ainsi que la distance d de la fibre par rapport à la face de sortie de la lame joue un rôle important sur l'allure et la résolution de cette répartition d'énergie (voir Figure 3.31).

En ajustant les valeurs de I_N et I_v afin de faire correspondre nos calculs à nos résultats expérimentaux, on est alors capable d'en déduire une puissance totale relative émise par chacune des sources ponctuelles, qu'elles soient au niveau de la couche de Nitrure ou bien en sortie de la lame de verre :

	Valeur de I_N issue de l'ajustement	Valeur de I_v issue de l'ajustement
Lame possédant une couche de Nitrure de 377 nm d'épaisseur	14	4,5
Lame possédant une couche de Nitrure de 65 nm d'épaisseur	19,5	4,5

Table 3.3 Valeur des intensités lumineuses I_v et I_N issues de l'ajustement des courbes expérimentales avec la méthode de déconvolution présentée précédemment.

Lorsque l'on trace les répartitions d'énergie mesurées et simulées on trouve alors :

Répartition de l'énergie dans une lame possédant une couche de Nitrure de 380 nm

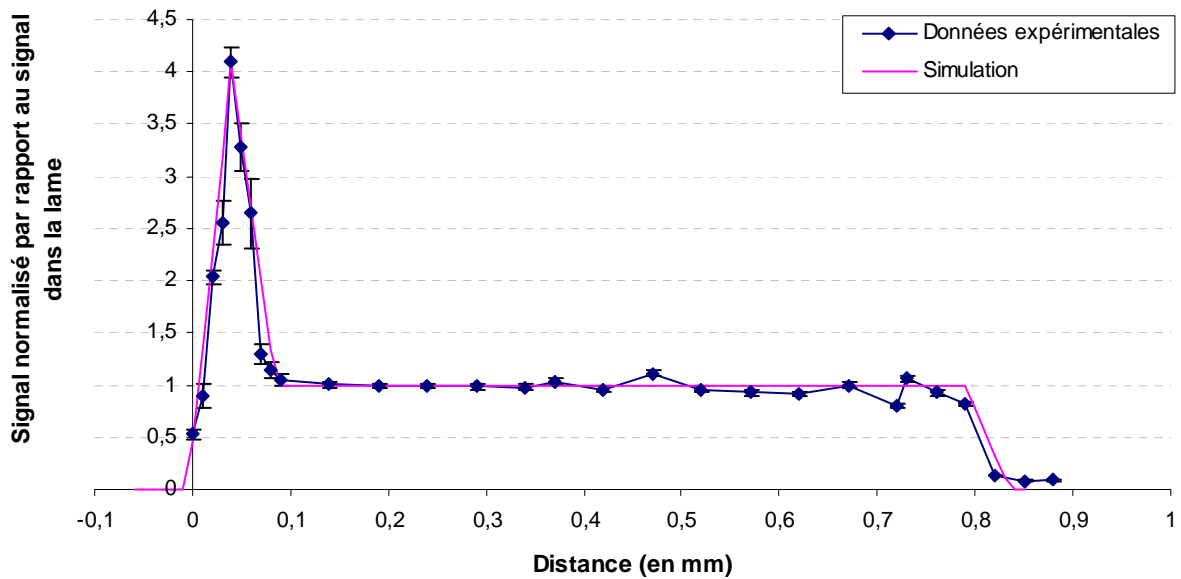


Figure 3.32. Répartition de l'énergie en sortie de la lame possédant une couche de Nitrure de 377 nm d'épaisseur à partir des données expérimentales (courbe bleue) ou calculée à partir du modèle décrit dans ce paragraphe et pour les valeurs $I_N = 14$ et $I_v = 4,5$.

Répartition de l'énergie dans une lame avec une couche de Nitrure de 65 nm

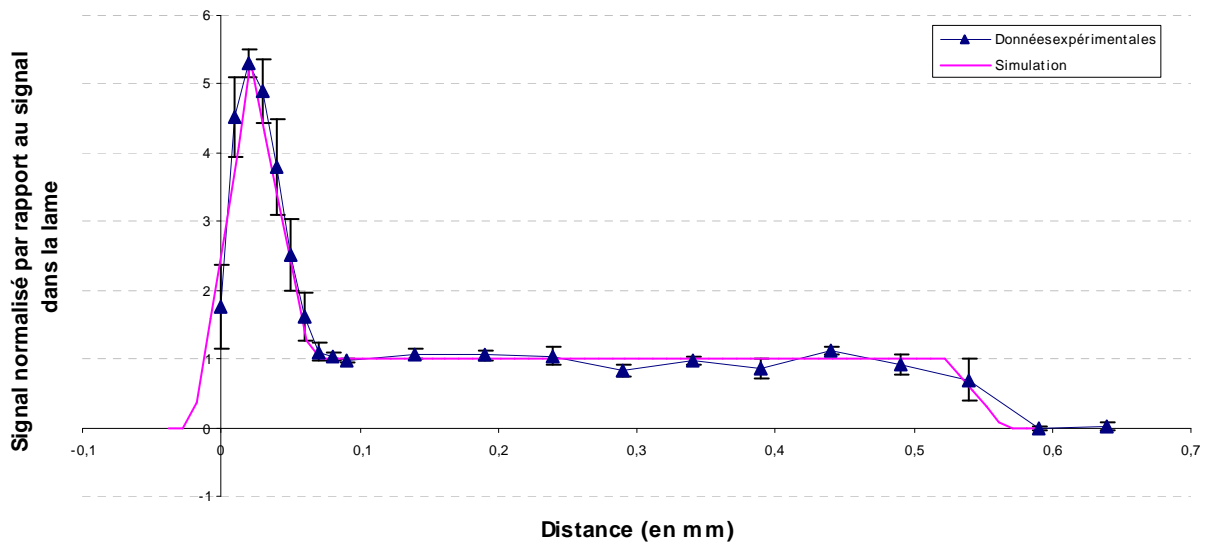


Figure 3.33. Répartition de l'énergie en sortie de la lame possédant une couche de Nitrure de 650 nm d'épaisseur à partir des données expérimentales (courbe bleue) ou calculée à partir du modèle décrit dans ce paragraphe et pour les valeurs $I_N = 19,5$ et $I_v = 4,5$.

La prise en compte des différentes ouvertures numériques (en sortie de couche de Nitrure, en sortie de la lame de verre, et en sortie de fibre) nous permet ensuite de ramener ces intensités en énergie totale P_{source} émise par ces

sources dans leur angle solide d'émission :

$$P_{source}^{v,N} = \frac{\Omega_{v,N}}{\Omega_{fibre}} I_{v,N} \quad \text{Eq. 3.2.}$$

où les lettres v et N font références aux sources situées au niveau de la lame de verre et de la couche de Nitrure respectivement et $\Omega_{v,N}$ et Ω_{fibre} représentent les angles solides en sortie de la lame (au niveau du verre ou de la couche) et en sortie de fibre.

L'intégration de ces puissances émises par ces sources ponctuelles sur l'ensemble de l'épaisseur e_d de la couche de Nitrure et de la lame de verre nous permet enfin d'en déduire une estimation de la fraction de la puissance qui est guidée dans la couche de Nitrure et dans la lame de verre.

On trouve par cette méthode que pour une lame de verre possédant une couche de Nitrure de Silicium de 377 nm d'épaisseur :

- environ 99,5 % de l'énergie se propage dans la lame de verre,
- et 0,5 % de l'énergie est confinée dans les modes guidés supportés par la couche de Nitrure de 377 nm d'épaisseur.

Et pour une lame possédant une couche de Nitrure de 65 nm d'épaisseur :

- environ 99,7 % de l'énergie se propage dans la lame de verre,
- et 0,3 % de l'énergie est confinée dans les modes guidés supportés par la couche de Nitrure de 65 nm d'épaisseur.

Ces expériences nous confirment donc que très peu d'énergie des dipôles est couplée dans les modes guidés des structures testés. Les couches utilisées ne permettent donc pas de confiner le signal en surface de lame.

3.3.5. Effets d'une couche mince – Conclusion

Les analyses décrites ci-dessus nous permettent de conclure sur plusieurs points.

Tout d'abord, nous remarquons que **le modèle de calcul de la puissance dissipée par le dipôle permet de bien décrire les phénomènes de couplage en champ proche utilisés dans l'instrument développé au laboratoire.**

Une sous-estimation systématique du signal couplé dans la lame est toutefois observée. Cette sous-estimation peut provenir de différents paramètres qui sont la précision des propriétés optiques (épaisseur et indice de réfraction) des couches minces testées, l'autofluorescence de ces couches minces ou encore la contribution des modes guidés que le modèle ne décrit qu'approximativement.

Ensuite, nous pouvons dire que :

- **l'écart d'indice entre la lame de verre et la couche mince doit être le plus important possible** afin d'avoir des effets significatifs sur la collecte du signal de fluorescence par la lame de verre. Les couches minces créées par échanges d'ions présentant un faible écart d'indice ne permettent par exemple pas d'améliorer les performances de l'instrument alors que des couches de Nitrure testées permettent d'améliorer d'un facteur d'environ 1,5 la collecte du signal dans la lame,
- **l'épaisseur optique de la couche mince est un paramètre critique sur les performances de l'instrument.** Cette épaisseur définit en effet les résonances et antirésonances des modes à fuite, modes

qui sont à l'origine de l'augmentation ou de la diminution de la collecte du signal dans la lame verre. Ainsi, suivant son épaisseur optique, une couche mince peut améliorer ou diminuer la quantité de signal couplé dans la lame,

- **une couche mince de fort indice de réfraction peut permettre**, suivant son épaisseur optique, **de réduire le volume de mesure** et donc diminuer la contribution non spécifique du signal de volume. La spécificité de la détection en est alors améliorée car seuls les fluorophores situés à proximité de la lame, c'est-à-dire capturés par les plots biologiques, pourront contribuer au signal. La lame possédant une couche de Nitrure de 200 nm a par exemple permis de diminuer d'un facteur 2 le signal de volume couplé dans la lame.

La couche de Nitrure de 200 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction de 2,2 a ainsi permis, en augmentant le signal couplé dans la lame et en réduisant le volume de mesure, d'améliorer d'un facteur 2 le rapport signal sur bruit en bout de lame.

Par ailleurs, l'analyse expérimentale de la quantité de signal couplée dans les couches minces de fort indice de réfraction a permis de montrer que très peu de signal y est confiné. Cela confirme donc les conclusions de l'étude théorique menée au chapitre 2 (voir § 2.5.3.3) entre les systèmes développés par Gachet et Seiler et l'instrument développé au laboratoire. L'utilisation de guides d'ondes afin d'acheminer le signal de plots fluorescents vers un détecteur n'est pas optimale en terme de flux. En effet, très peu de signal est couplé dans ces guides alors qu'une quantité beaucoup plus importante est couplée dans le substrat entraînant une perte de contraste en bout de lame. La solution la plus adaptée semble donc être celle de l'instrument développé au laboratoire qui utilise une excitation séquentielle de chacun des plots biologiques afin de détecter l'ensemble des signaux couplé dans la couche mince ainsi que dans la lame sans avoir de mélange des signaux des différents plots biologiques.

En conclusion, une couche mince de fort indice de réfraction à la surface d'une lame de verre peut permettre d'améliorer le rapport signal sur bruit en bout de lame en augmentant la quantité de signal couplé dans le composant et en réduisant la contribution des signaux de volume. Cependant, elle ne permet pas de confiner le signal en surface et ne collecte qu'une très faible fraction du signal émis par les plots fluorescents.

3.4. Effet d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED

Intéressons nous à présent, aux possibilités d'intégrer des sources d'excitation de type OLED dans le composant de l'instrument développé au laboratoire.

Après avoir présenté les différents sources qu'il nous a été possible de caractériser, nous décrirons, à l'aide des modèles théoriques développés au chapitre 2 et de la caractérisation expérimentale de ces composants, les différents effets d'une cavité Fabry Pérot sur les propriétés d'émission d'une OLED. Cela nous permettra alors d'apporter plusieurs éléments de réponse quant à la possibilité d'intégrer ce type de source dans notre instrument.

3.4.1. Description des composants testés

Dans ce paragraphe, nous allons décrire les différentes sources organiques que nous avons testées. La réalisation de ces sources a été effectuée en collaboration avec deux partenaires différents :

- le Département Intégration Hétérogène sur Silicium (DIHS) du CEA-Grenoble qui développe une technologie OLED pour les domaines de l'éclairage et des micros display. Cette collaboration nous a permis de réaliser un démonstrateur OLED pour notre projet et de caractériser les propriétés optiques de ces sources sans cavité,
- les laboratoires de Physico Chimie des Matériaux Luminescents (LPCML) et de Physique de la Matière Condensée et Nanostructures (LPMCN) de l'université Claude Bernard à Lyon 1. Cette collaboration a eu pour but de réaliser des cavités Fabry Péroth à l'intérieur desquelles est déposée une couche luminescente afin d'en étudier les propriétés optiques.

3.4.1.1. OLED réalisées par le DIHS

Technologie utilisée

La technologie utilisée par le DIHS se base sur le dépôt sous vide de molécules organiques de faibles poids moléculaire et de couches métalliques. Ce processus est entièrement automatisé à l'intérieur d'un automate qui permet successivement de :

- préparer la surface du substrat et d'y déposer une couche d'ITO servant d'électrode transparente,
- déposer par évaporation thermique les différentes couches composant l'OLED,
- déposer les couches métalliques (Argent, Aluminium, ...) servant de seconde électrode,
- encapsuler l'OLED afin de la protéger de l'humidité et de l'oxygène et d'augmenter ainsi son temps de vie.

Cette technologie est aujourd'hui reproductible et a permis de réaliser un grand nombre de démonstrateurs allant des OLED blanches à des OLED sur surface souple jusqu'au micro display de 3 pouces de diagonale fonctionnant en mode vidéo.

Description des OLED réalisées

Deux démonstrateurs d'OLED (voir Figure 3.34) ont été réalisés par le DIHS à partir de deux matériaux électroluminescents différents : l'Alq3 et un dopant rouge dont les spectres d'émission se situent vers 520 et 650 nm respectivement (voir Figure 3.46).

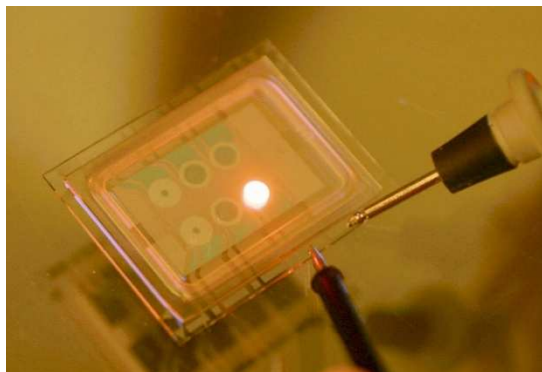


Figure 3.34. Photographie du démonstrateur OLED réalisé par le DIHS à partir du matériau Alq3.

Ces OLED sont constituées d'un empilement de cinq couches organiques comprises entre une cathode en Argent et une anode en Aluminium. Sur la Figure 3.35 sont données les différentes épaisseurs des OLED rouges réalisées par le DIHS. Le nombre et l'empilement de couches reste le même pour les OLED vertes, les épaisseurs sont simplement différentes et adaptées à la longueur d'onde de l'Alq3.

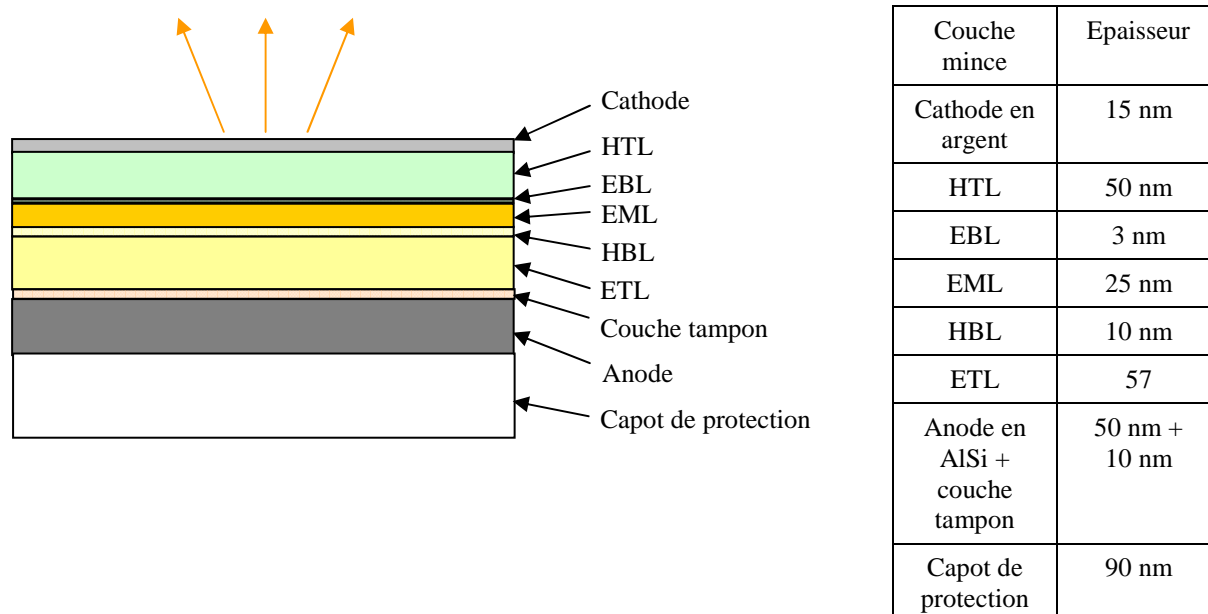


Figure 3.35. Structure et dimension des différentes couches des OLED rouges réalisées par le DIHS.

Afin de simuler ces structures, nous considérerons par la suite une seule couche organique dont l'épaisseur est la somme des épaisseurs des différentes couches représentées sur la Figure 3.35, soit $d_1 \approx 145$ nm, et dont l'indice de réfraction est environ de 1,7, correspondant à l'indice de réfraction d'une couche luminescente d'Alq3 dans son domaine spectral d'émission.

Afin de contrôler les performances et la stabilité de leur technologie, le DIHS a effectué plusieurs caractérisations sur ces sources. Elles portent principalement sur les propriétés de luminance et de rendement lumineux. Nous ne présenterons pas ces résultats car ces mesures ne concernent pas directement nos problèmes de filtrage et de directivité et qu'il ne nous a pas été possible de réaliser des mesures comparatives de puissance des différentes sources testées. Les sources réalisées par le DIHS possèdent un rendement quantique externe compris entre 4 et 8 %, ce qui est dans l'état de l'art actuel des OLED, et émettent de la lumière à partir d'une tension de seuil de 2,5 Volts.

3.4.1.2. Sources réalisées par le LPCML et le LPMCN

Les sources réalisées par le LPCML et le LPMCN ne sont pas exactement des OLED car leur excitation se fait par voie optique. En effet, afin de dissocier les problèmes d'injection des porteurs de charges des effets de la cavité Fabry Péro, nous avons choisi de réaliser des sources pompées optiquement. De plus, nous contournons ainsi les problèmes technologiques liés à la fabrication d'OLED pompées électriquement et placées dans des cavités.

Les sources ainsi réalisées sont composées d'un miroir métallique et d'un miroir dit "de Bragg" réalisé par un empilement de plusieurs couches minces diélectriques. Les valeurs des indices de réfraction et épaisseurs des différentes couches constituant la cavité sont données sur la figure suivante :

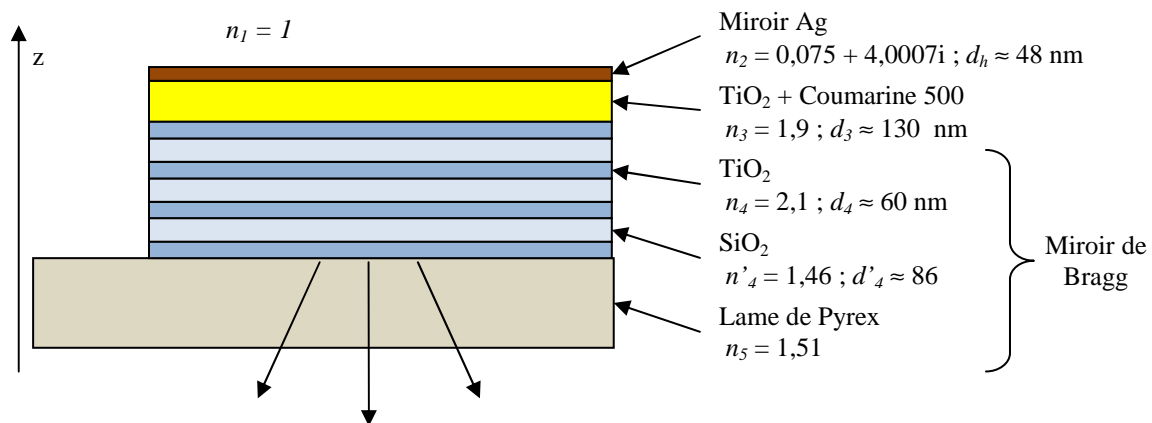


Figure 3.36. Schéma représentant les cavités réalisées par les laboratoires LPCML et LPMCN afin d'étudier les propriétés optiques d'une couche lumineuse (Coumarine 500) située à l'intérieur d'une cavité Fabry Péro. Sont indiqués les valeurs des épaisseurs et indices de réfraction des différentes couches minces constituant la cavité (Mohamed 2007).

Technologie utilisée

Deux technologies ont été utilisées afin de déposer les différentes couches minces constituant les cavités que nous avons testées :

- un procédé Sol-Gel par Dip Coating, ou trempage, utilisé afin de réaliser les différentes couches minces du miroir de Bragg ainsi que la couche émettrice contenant les fluorophores organiques,
- un procédé de dépôt sous vide par évaporation thermique utilisé pour le dépôt de la couche métallique constituant le miroir réfléchissant de la cavité.

Le procédé Sol-Gel par Dip Coating utilisé pour le dépôt des différentes couches diélectriques de la cavité consiste en trois principales étapes :

- la préparation d'une solution, le Sol, contenant des précurseurs chimiques du matériau que l'on désire déposer en couche mince,
- le trempage du substrat dans le Sol afin de créer un dépôt de solution à sa surface qui après séchage et polymérisation forme la couche mince,
- le recuit de la couche mince ainsi obtenue afin de la stabiliser.

Le procédé Sol-Gel permet de fabriquer un polymère inorganique, que l'on peut doper à l'aide de composés

organiques par des réactions chimiques simples et à une température proche de la température ambiante (20 à 150 °C). La préparation de Sol est réalisée à partir d'une solution de précurseurs du matériau à déposer dans un solvant. Au contact de l'eau, la polymérisation du Sol est activée. C'est lors de cette polymérisation qu'il est possible de doper le matériau avec des composés organiques afin de modifier les propriétés optiques du matériau final.

Une fois le Sol contenant ces longues chaînes créé, on y trempe un substrat sur lequel les chaînes de polymères vont former un mince film qui, lors du tirage du substrat hors du Sol et de l'évaporation du solvant restant, va se solidifier et former une couche mince. Enfin, afin d'obtenir une couche mince stable et homogène, il est nécessaire de recuire les couches ainsi formées à des températures de l'ordre de 300°C.

De nombreux paramètres peuvent être utilisés afin de contrôler l'épaisseur de la couche créée. Tout d'abord, lors de la réalisation du Sol, la température, le pH et la concentration en précurseurs permet de contrôler la vitesse de polymérisation et la viscosité de la solution, deux paramètres qui influent sur la quantité de matériel déposé sur le substrat lors de son trempage dans le Sol. Ensuite, intervient principalement la vitesse de tirage avec laquelle il est possible de contrôler précisément l'épaisseur de la couche déposée. Enfin, le recuit va permettre de fixer l'épaisseur et l'indice de réfraction de la couche déposée dans le temps. Suivant la température de recuit, la couche mince créée aura un indice de réfraction plus ou moins important.

Pour plus de précision sur le procédé Sol-Gel utilisé pour la réalisation de ces cavités et sur le protocole utilisé, nous nous rapporterons au rapport de stage de M. Mohamed (Mohamed 2007).

La couche luminescente

Pour des raisons de disponibilité des fluorophores organiques dans les laboratoires LPCML et LPMCN, il a été choisi d'utiliser la Coumarine 500 (C500) comme dopant du Sol afin de réaliser une couche photo-luminescente. Le pic d'absorption de ce colorant se situe à 370 nm et le pic d'émission à 500 nm (voir Figure 3.37). Deux matrices pouvant être dopées par la Coumarine 500 ont été testées comme couches luminescentes : le SiO₂ et le TiO₂. Cette dernière matrice a finalement été choisie car (Mohamed 2007) :

- son indice de réfraction est supérieur à celui du SiO₂ et, du fait d'un recuit moins important (à 60°) que pour les couches composant le miroir de Bragg (recuite à 300°C), permet d'avoir un indice de réfraction inférieur à la dernière couche du miroir,
- le silicium de la matrice SiO₂ émet un signal à 400 nm en plus du signal du colorant organique C500 qui peut gêner les mesures,
- le solvant du colorant C500 étant le même que celui utilisé pour la matrice de TiO₂, le dopage de cette dernière est plus simple à réaliser que le dopage d'une matrice de SiO₂ qui utilise un solvant différent.

Les couches organiques ainsi créées n'ont pas fait l'objet d'un recuit trop important (recuit à 60°C) afin, d'une part, de ne pas détruire les propriétés optiques du colorant C500 et, d'autre part, d'obtenir un indice de réfraction de la couche inférieur à l'indice de réfraction des couches de TiO₂ constituant le miroir de Bragg et recuite à 300°C.

Bien que le pic d'émission de ce fluorophore ne se situe pas dans le domaine d'absorption des fluorophores que l'on utilise dans nos protocoles biologiques, cela nous a permis d'étudier les effets d'une cavité Fabry-Pérot sur les propriétés d'émission d'une couche luminescente. Il suffira par la suite de modifier les propriétés physiques

de la cavité (épaisseur, miroir de Bragg, ...) en fonction de la couche luminescente choisie pour exciter nos fluorophores afin de réaliser une OLED pouvant être utilisée dans notre système.

Spectre d'une couche TiO₂ dopée à l'aide du fluorophore Coumarin 500

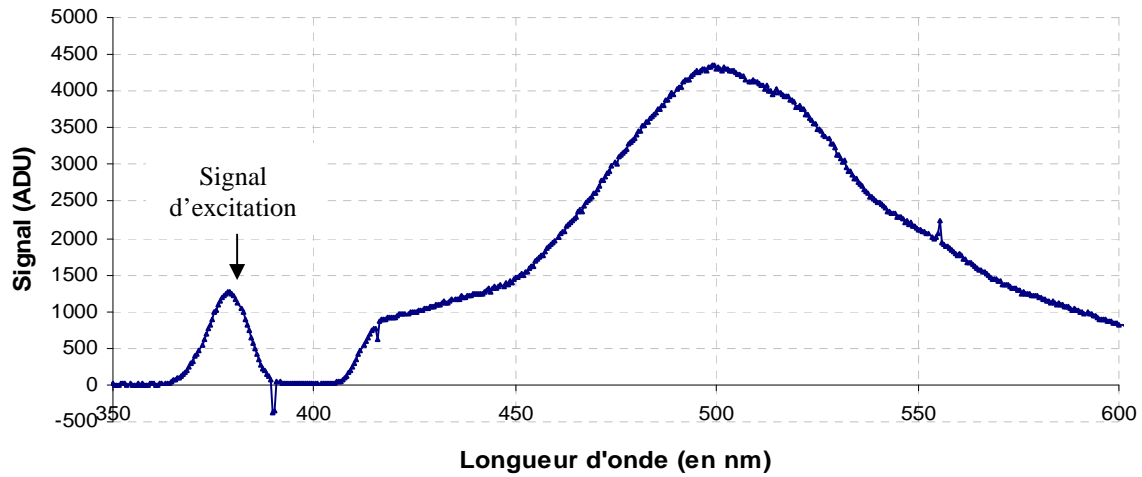


Figure 3.37. Spectre d'une couche de TiO₂ dopée à l'aide d'un fluorophore organique, la Coumarine 500. Ce spectre a été obtenu en excitant la couche émettrice à l'aide d'une diode UV centrée sur 470 nm. Un ADU (Analog to Digital Unit) représente 1 pas de la conversion du signal analogique en signal numérique par la caméra CCD du spectrographe.

Les cavités Fabry Péroต์ réalisées ont alors été dimensionnées à partir des propriétés optiques de la Coumarine 500.

La cavité que nous avons réalisée étant constituée d'un miroir Bragg et d'un miroir métallique, l'épaisseur optique de la cavité doit prendre en compte l'épaisseur optique de la couche luminescente, ainsi que les longueurs de pénétration dans ces deux miroirs. Cette épaisseur optique est donnée par (Dodabalapur 1996) :

$$L(\lambda) \approx \frac{\lambda}{2} \left(\frac{n}{\Delta n} \right) + n_3 \cdot d_3 + \left| \frac{\varphi_m}{4\pi} \lambda \right| \quad \text{Eq. 3.3.}$$

où le premier terme représente la longueur de pénétration dans le miroir de Bragg (n est l'indice de réfraction moyen des couches constituant le miroir et Δn la différence d'indice), le deuxième terme est l'épaisseur optique de la couche luminescente et le troisième représente le déphasage dû à la réflexion sur le miroir métallique avec :

$$\varphi_m = \arctan \left(\frac{2n_3\kappa_m}{n_3^2 - n_m^2 - \kappa_m^2} \right) \quad \text{Eq. 3.4.}$$

où n_3 est l'indice de la couche organique en contact avec la couche métallique et $n = n_m + \kappa_m.i$ est l'indice imaginaire de la couche métallique.

Par ailleurs, la théorie des cavités Fabry-Pérot (Benisty 1998 a) montre que pour avoir une émission normale à la cavité, la longueur optique de cette dernière doit satisfaire la relation suivante :

$$m_c \lambda_{em} = 2L(\lambda_{em}) \quad \text{Eq. 3.5.}$$

où λ_{em} est la longueur d'onde d'émission que l'on prend ici égale à 500 nm afin de correspondre au pic d'émission de la Coumarine 500, et m_c , entier naturel positif, représente l'ordre de la cavité.

L'ordre m_c de la cavité définit le nombre de modes de la cavité. Afin de n'avoir qu'une émission normale à cette dernière, c'est-à-dire qu'un seul mode de la cavité extrait, il est donc nécessaire de minimiser cet ordre.

Nous avons donc choisi de réaliser **une couche active d'une épaisseur d'environ 130 nm** afin de satisfaire la relation 3.5 pour un ordre de cavité $m_c = 4$. Un ordre de cavité plus faible aurait nécessité la réalisation de couche de quelques nanomètres d'épaisseur beaucoup plus difficile à contrôler.

Le miroir de Bragg

Le miroir de Bragg qui a été réalisé est constitué d'une alternance de couches SiO_2 et TiO_2 dont les indices de réfraction, après un recuit à 300°C, sont de 1,46 et de 2,1 respectivement.

Nous avons choisi de réaliser un miroir de Bragg dont les épaisseurs optiques des différentes couches sont égales au quart de la longueur d'onde centrale de réflexion du miroir, soit ici 500 nm pour correspondre au pic d'émission de la couche lumineuse utilisée. Les épaisseurs d_4 et d'_4 des couches de haut et bas indice constituant la cavité sont donc de :

$$d_4 = \frac{\lambda_B}{4n_4} \approx 60 \text{ nm} \text{ et } d'_4 = \frac{\lambda_B}{4n'_4} \approx 86 \text{ nm} \quad \text{Eq. 3.6.}$$

où λ_B représente la longueur d'onde centrale de réflexion du miroir, soit $\lambda_B = 500 \text{ nm}$.

A partir de simulations effectuées à l'aide du modèle présenté au paragraphe 2.5.2, nous avons ensuite défini le nombre de couches que devait avoir ce miroir afin d'obtenir une émission de demi-largeur à mi-hauteur d'environ 30° (voir § 2.3.2). Ces simulations ont montré qu'une cavité réalisée à l'aide d'un miroir métallique, dont le coefficient de réflexion est proche de 100 %, et un miroir de Bragg dont le coefficient de réflexion à sa longueur d'onde centrale est de l'ordre de 85 % permet d'obtenir une telle directivité :

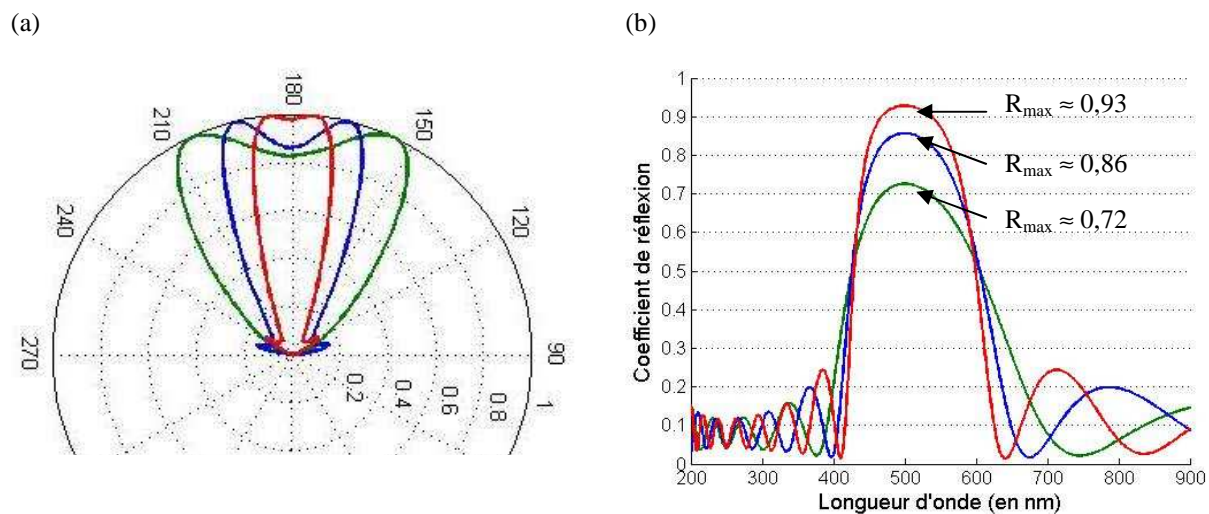


Figure 3.38. (a) : Diagrammes d'émission normalisés en coordonnées polaires de trois cavités constituées d'un miroir métallique et d'un miroir de Bragg composé de 2,5, 3,5 et 4,5 paires de couches de haut et bas indice de réfraction. Ces calculs ont été effectués pour une émission à 500 nm et une couche active d'épaisseur de 130 nm et d'indice de réfraction de 1,9. (b) : Profil du coefficient de réflexion des trois miroirs de Bragg utilisés pour les simulations du (a).

Nous avons donc choisi d'utiliser des miroirs de Bragg constitués d'une alternance de 3,5 couches de haut et bas indice de réfraction pour la réalisation de nos cavités.

Les miroirs de Bragg réalisés par le LPCML et le LPMCN ont fait l'objet d'une caractérisation en transmission donnée en Figure 3.39.

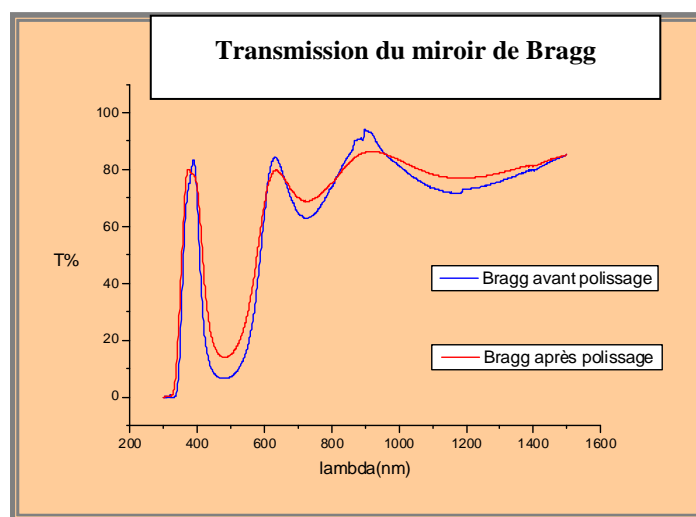


Figure 3.39. Courbe de transmission des miroirs de Bragg réalisés au LPCML et LPMCN. La courbe bleue représente la transmission d'un substrat sur lequel est déposé un miroir sur les deux faces. La courbe rouge est la transmission d'un seul miroir.

Nous retrouvons bien la courbe inverse à celle calculée sur la Figure 3.38 (b). Les miroirs de Bragg réalisés ont bien leur longueur d'onde centrale de réflexion à 500 nm et présentent une réflexion de l'ordre de 85 % (aucun des matériaux SiO_2 , TiO_2 , et substrat (en verre) utilisés ne présentent de pertes à ces longueurs d'onde).

Nous avons représenté ici deux courbes de transmission correspondant à la transmission de deux (courbe bleue) et

un (courbe rouge) miroirs de Bragg du fait de l'étape technologique supplémentaire que nous avons dû réaliser. En effet, la technologie de Dip coating utilisée pour réaliser le miroir de Bragg dépose des couches minces sur les deux faces de l'échantillon. Il a donc fallu polir une des faces de l'échantillon afin de n'avoir qu'un seul miroir par substrat. Ces courbes nous ont donc en plus permis de contrôler l'étape de polissage sur les propriétés des miroirs.

Il faut noter que cette étape de polissage a aussi dû être réalisée sur la couche luminescente afin de n'avoir qu'une seule couche active à l'intérieur de la cavité. Cependant cette étape est relativement agressive (collage et décollage d'une résine directement sur la couche luminescente) et a entraîné une perte de rendement quantique et une rugosité plus importante de la couche active (voir la caractérisation de ces cavités).

Miroir Métallique

En dernière étape, un miroir métallique a été déposé à l'aide d'une méthode de dépôt sous vide par évaporation thermique.

Afin d'obtenir un coefficient de réflexion proche de 100 % du miroir métallique, une couche de 50 nm d'Argent a été déposée par cette technique à la surface de la couche luminescente. Une telle couche d'argent permet en effet d'atteindre un coefficient de réflexion de 0,967 à la longueur d'onde $\lambda_{em} = 500$ nm, ce qui est suffisamment proche de 1 pour nos essais. Ce coefficient a été évalué grâce au calcul des coefficients de réflexion de Fresnel sur une couche d'Argent de 50 nm d'épaisseur d'indice de réfraction de $n_{Ag} = 0,075 + 4,0007i$ (Barnes 1998) comprise entre un milieu d'indice de réfraction $n_0 = 1$ (milieu extérieur : air) et un milieu d'indice de réfraction $n_l = 1,9$ (couche organique).

Présentation de la cavité complète

Enfin, il a été décidé de réaliser sur chaque substrat trois épaisseurs de cavité différentes à l'aide d'une couche optiquement neutre (réalisée en TiO_2 mais recuite de la même manière que la couche luminescente pour obtenir le même indice de réfraction). En effet, cela va permettre de caractériser expérimentalement l'effet de l'épaisseur de la cavité sur ses propriétés spectrales et spatiales d'émission. Il a ainsi été déposées deux couches neutres d'une épaisseur de 5 à 10 nm :

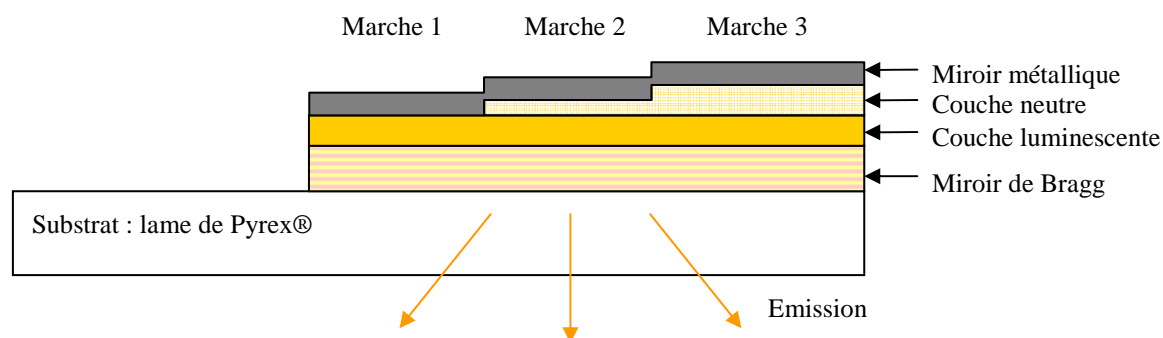


Figure 3.40. Schéma des échantillons réalisés par le LPCML et le LPCMN présentant 3 cavités de différentes épaisseurs sur un même substrat que nous nommons marche 1, 2 et 3.

3.4.2. Augmentation du signal émis dans les modes de la cavité

A présent, intéressons nous aux effets d'une cavité Fabry Péro sur les propriétés d'émission d'une OLED. Tout d'abord, regardons l'évolution de la puissance émise en fonction des propriétés de ces cavités.

Une cavité Fabry Péro a pour effet de forcer les dipôles à émettre dans certains modes, les modes de la cavité. Ainsi l'énergie émise normalement dans les 4π sr de l'espace se retrouve confinée dans les n modes de la cavité défini par l'ordre m_c de cette dernière. La puissance émise dans les directions de ces modes est donc augmentée par rapport à l'émission d'un ensemble de dipôles hors d'une cavité. Ainsi, plus ces modes seront resserrés autour d'une direction (c'est-à-dire plus la finesse¹ de la cavité est importante) et plus il y aura d'énergie dans cette direction :

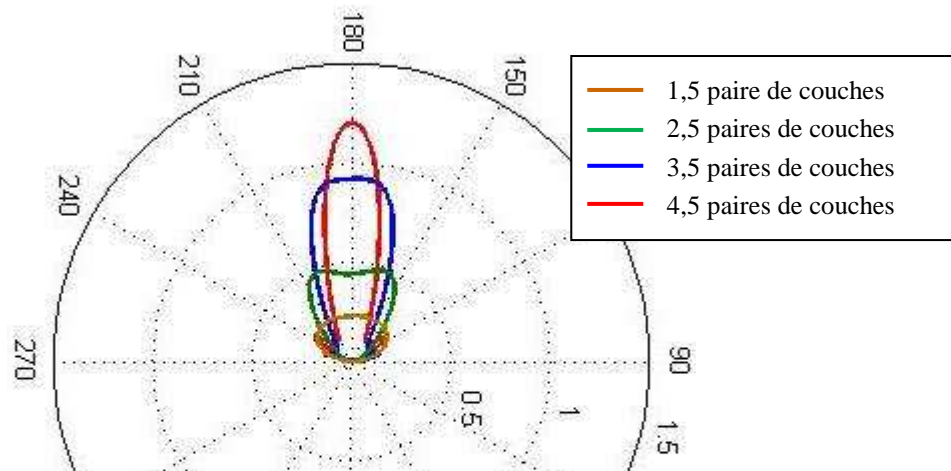


Figure 3.41. Diagramme d'émission en coordonnées polaires de quatre cavités constituées par un miroir métallique ($R \approx 100\%$) et un miroir de Bragg composé de 1,5, 2,5, 3,5 et 4,5 paires de couches de haut et bas indice de réfraction. Ces simulations ont été réalisées pour une émission à 510 nm et une épaisseur de couche active de 130 nm.

Cependant, une finesse trop importante de cavité entraîne aussi une dispersion angulaire des différents modes de la cavité (Benisty 1998 b). L'extraction de la lumière dans les modes de la cavité est donc amélioré jusqu'à une certaine finesse pour laquelle de nombreux modes se retrouvent piégés dans la structure et ne sont pas extraits.

¹ La finesse F d'une cavité est définie à partir des coefficients de réflexion R_1 et R_2 des deux miroirs composant

la cavités :
$$F = \frac{\pi(R_1 R_2)^{1/4}}{1 - \sqrt{R_1 R_2}}$$
 Elle est directement liée à la largeur spectrale et spatiale des modes de la cavité. Plus la finesse sera grande, et plus les modes de cavités seront étroits spectralement et spatialement.

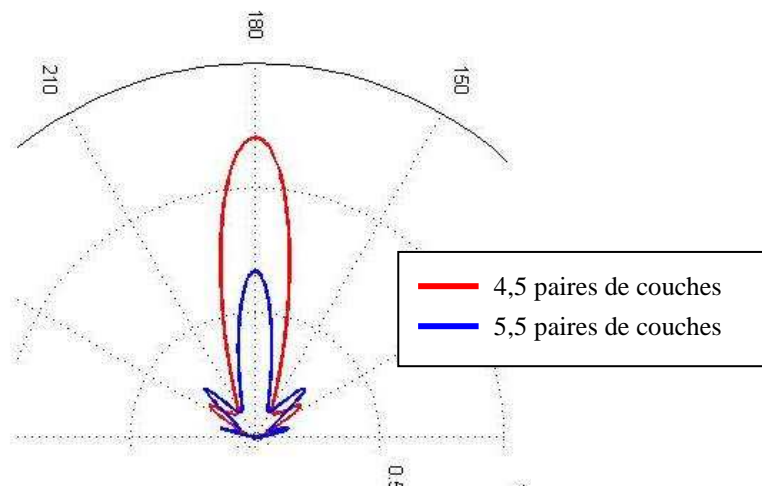


Figure 3.42. Diagramme d'émission en coordonnées polaires de deux cavités constituées par un miroir métallique ($R \approx 96\%$) et un miroir de Bragg composé de 4,5 et 5,5 paires de couches de haut et bas indice de réfraction. Ces simulations ont été réalisées pour une émission à 500 nm et une épaisseur de couche active de 132 nm.

Un compromis doit donc être trouvé entre l'extraction de la lumière et la dispersion angulaire des différents modes de la cavité. Cela est d'autant plus critique que le spectre d'émission des dipôles situés à l'intérieur de la cavité est large. En effet, plus ce spectre est large, plus la dispersion angulaire est importante. Benisty et al. (Benisty 1998 b) donne ainsi des règles afin d'optimiser la puissance émise dans les modes extraits de la cavité en fonction de la largeur spectrale d'émission des dipôles et de la finesse de la cavité. On remarque que plus la largeur spectrale de la couche luminescente est grande et moins il sera possible d'avoir un diagramme d'émission directif sans dispersion angulaire. Cela peut poser problème pour l'intégration des OLED dans l'instrument développé au laboratoire du fait du large spectre de ces sources.

L'utilisation d'une cavité dans l'instrument développé au laboratoire doit donc permettre d'augmenter la densité de puissance d'excitation au niveau des plots biologiques par rapport à une OLED seule, ce qui peut compenser une émission plus faible que les sources inorganiques externes utilisées actuellement.

Nous n'avons toutefois pas pu caractériser expérimentalement cet effet de cavité pour les raisons suivantes. Les échantillons réalisés par le LPCML et le LPMCNC n'étant pas protégés de l'humidité et de l'oxygène, ils étaient très peu stables dans le temps. Il était donc difficile de comparer la puissance émise par les différents échantillons car il nous était impossible de contrôler leur dégradation au cours du temps. De plus, l'étape de polissage des échantillons a aussi pu dégrader leurs performances de façon non contrôlable. Les mesures qui seront présentées par la suite seront donc des mesures que nous avons normalisées afin de ne pas prendre en compte les différences de puissances émises qu'il nous a été impossible de contrôler et de simuler.

3.4.3. Filtrage spectral

Ce paragraphe a pour but d'étudier les effets d'une cavité Fabry Péro sur les propriétés spectrales d'émission de dipôles. En effet, nous avons vu qu'il était indispensable de filtrer l'émission des sources OLED afin de pouvoir les intégrer dans le composant de l'instrument développé au laboratoire sans pertes de performances (voir § 2.3.2).

Nous allons donc montrer ici, à l'aide des modèles théoriques développés au chapitre 2 et de la caractérisation des échantillons qui ont été réalisés au DIHS et aux LPCML et LPMCEN, qu'une cavité Fabry Péro permet :

- de réduire l'intervalle spectral d'émission des dipôles,
- d'ajuster la longueur d'onde centrale du ou des pics d'émission à l'intérieur de l'intervalle spectral d'émission des dipôles seuls.

Le modèle développé à partir des travaux de Benisty et al. (Benisty 1998 a) permet de simuler à la fois le diagramme d'émission de dipôles situés à l'intérieur d'une cavité Fabry Péro pour une longueur d'onde d'émission donnée, et de calculer le spectre d'émission de ces mêmes dipôles pour un angle d'émission donné. Utilisons ce dernier calcul afin d'étudier l'effet de ce type de cavité sur les propriétés spectrales d'émission des OLED.

Considérons des dipôles dont le spectre d'émission correspond à celui du colorant C500 situé dans une matrice de TiO_2 (voir Figure 3.37). Ce spectre a été mesuré en excitant une couche de TiO_2 dopée par le colorant C500 et déposée par une technique de Dip-Coating sur un substrat en verre. La source utilisée pour exciter cette couche est une diode UV émettant à 370 nm.

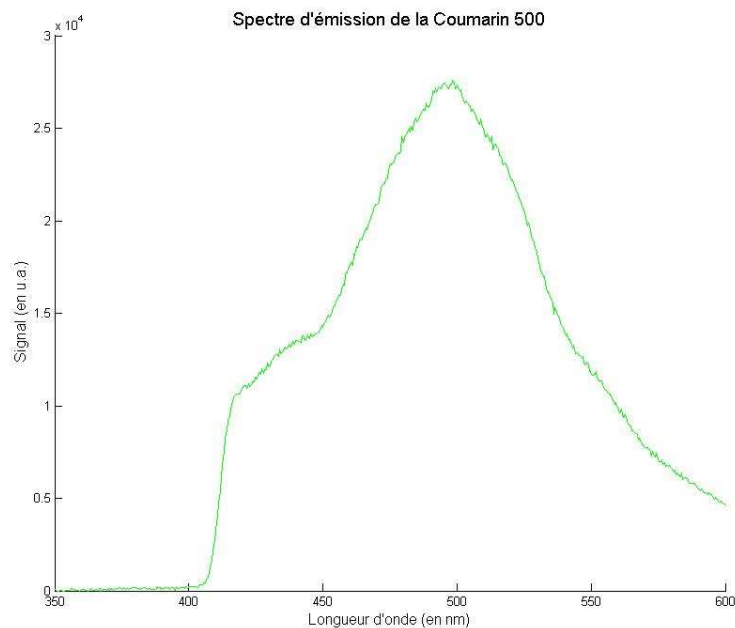


Figure 3.43. Spectre d'émission de la Coumarine 500 excitée à 370 nm à l'aide d'une diode UV TOYODA et mesuré par un spectrographe à fibre Andor Shamrock SR-163.

En introduisant ce spectre dans les calculs développés au chapitre 2, nous sommes alors capables de simuler l'effet d'une cavité Fabry Péro sur l'émission du colorant C500.

3.4.3.2. Influence de la finesse de la cavité

Intéressons nous ici au resserrement du spectre d'émission du fait de la finesse de la cavité Fabry Péro.

Soit une cavité Fabry Péro composée d'un miroir métallique dont on considère le coefficient de réflexion constant ($R_{\text{Ag}} = 0,967$), et un miroir de Bragg dont on fait varier le nombre Nb de paires de couches de haut et

bas indice de réfraction afin de modifier la finesse de la cavité. Les dipôles situés à l'intérieur de cette cavité ont le spectre d'émission du colorant C500.

On calcule alors que le spectre en sortie du miroir de Bragg, en fonction du nombre de paires de couches le composant, est :

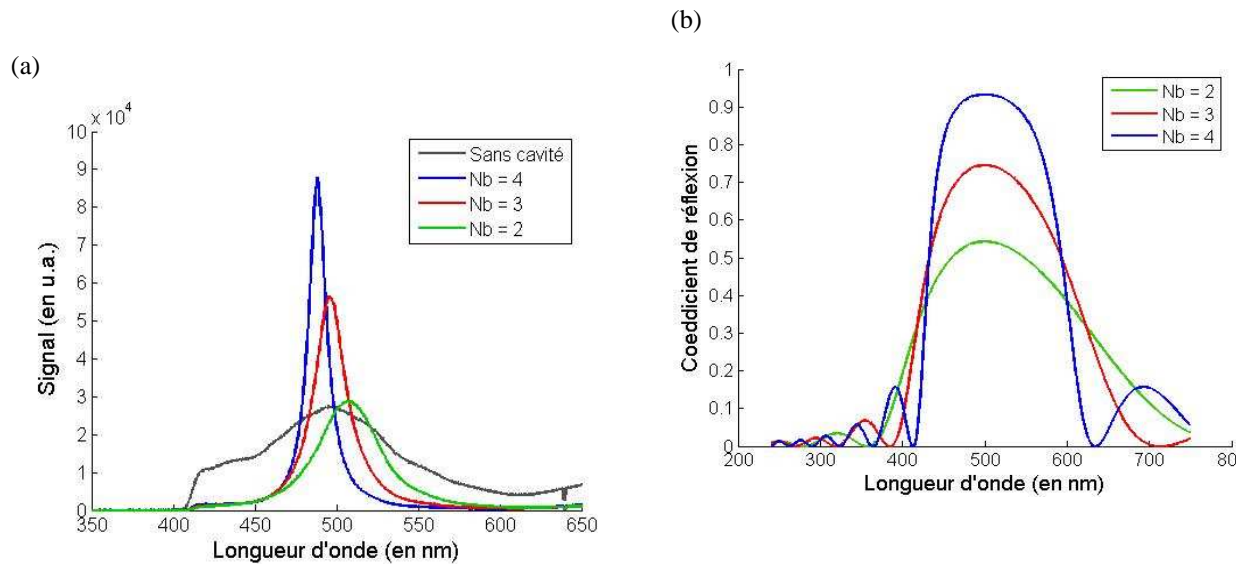


Figure 3.44. (a) : Spectre d'émission d'une couche luminescente placée dans une cavité Fabry Péro d'épaisseur optique de 250 nm constituée par un miroir métallique de coefficient de réflexion constant ($R_{\text{metal}} = 0,96$) et d'un miroir de Bragg centré sur 500 nm dont on fait varier le nombre de paires de couche de haut et bas indice. (b) : Profil du coefficient de réflexion du miroir de Bragg suivant le nombre de paires de couches $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ dont il est constitué.

On remarque alors que :

- plus la finesse de la cavité est importante, et plus le spectre d'émission de la cavité est resserré autour d'une longueur d'onde,
- plus la finesse de la cavité est importante est plus l'énergie confinée dans le mode de la cavité est grande.

Nous avons pu caractériser cet effet expérimentalement grâce aux échantillons réalisés par le LPCML et le LPMC. En effet, la mesure du spectre de la marche 1 (voir Figure 3.40) pour une émission normale à la cavité donne :

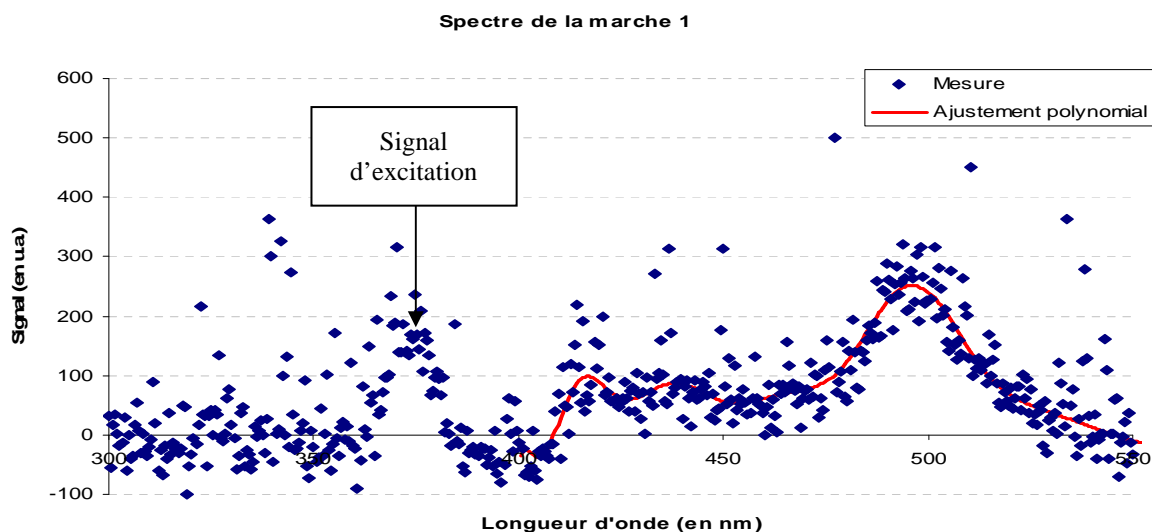


Figure 3.45. Spectre de la marche 1 de notre échantillon pour un angle d'émission $\theta = 0$ avec ajustement polynomial de degré 20 du spectre entre 400 et 550 nm. Ce spectre est obtenu sur le banc spectro-goniométrique pour un temps d'acquisition de 1000 s et la cavité est excitée à l'aide d'une diode centrée sur 370 nm.

La première remarque que l'on peut faire est la faiblesse du signal mesuré le rendant très bruité. Cela s'explique par :

- le faible angle solide d'émission qu'intercepte la fibre du spectromètre,
- la faible puissance d'émission de nos cavités du fait de leur faible stabilité dans le temps,
- le recuit de la couche émettrice qui a pu endommager les fluorophores de cette couche rendant la conversion de lumière moins efficace,
- l'étape de polissage qui a aussi pu endommager la couche émettrice.

Nous avons donc décidé d'ajuster les spectres mesurés à l'aide d'un polynôme (courbe rouge de la Figure 3.45) et d'étudier les propriétés de ces cavités à partir de ces ajustements polynomiaux. Nous avons ainsi réalisé un ajustement polynomial sur chacun des spectres mesurés après avoir soustrait le signal d'offset mesuré sur le domaine 250 – 350 nm où nous n'avons aucun signal ni d'excitation ni d'émission. Ces ajustements ont été réalisés à partir de polynômes d'ordre 20. Ce degré a été choisi comme compromis afin de bien suivre les évolutions du spectre tout en minimisant les artefacts d'un tel ajustement comme par exemple les bosses observées vers 420 et 440 nm.

On observe alors sur ce spectre une importante réduction de l'intervalle spectral d'émission du colorant C500 par rapport à son spectre hors cavité (voir Figure 3.43). On calcule que la largeur spectrale d'émission de la Coumarine 500 sans cavité est de l'ordre de 200 nm alors que la largeur spectrale d'émission de la marche 1 est de l'ordre de 30 nm. Une cavité Fabry Péro a donc bien pour effet de resserrer le spectre d'émission de la couche lumineuse.

Dans le cas des OLED réalisées par le DIHS qui ne sont pas situées à l'intérieur d'une cavité Fabry Péro, on n'observe pas de réduction de l'intervalle spectral d'émission :

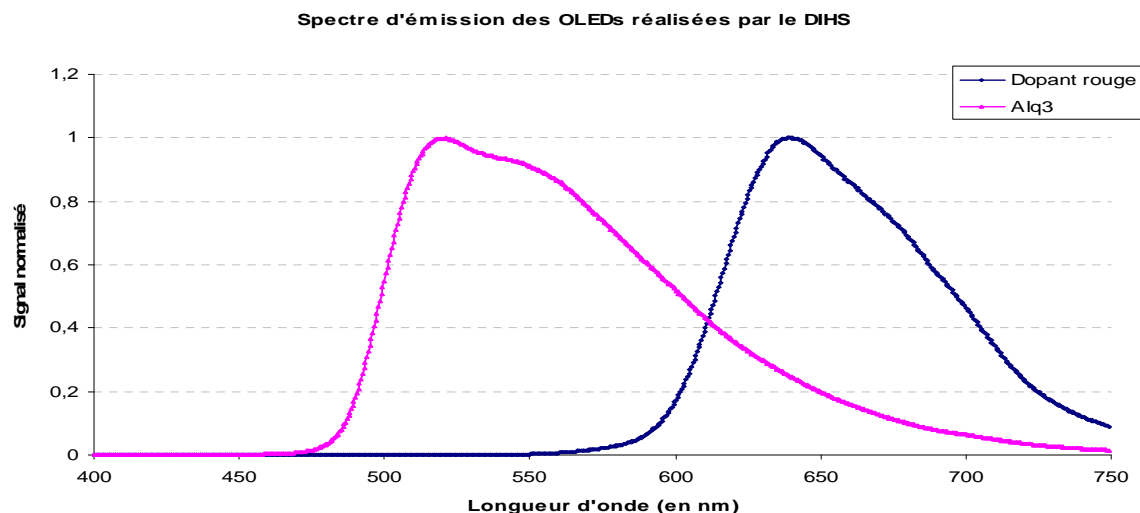


Figure 3.46. Spectre des deux types d'OLED réalisées par le DHIS. En bleu est représenté le spectre à partir du matériau luminescent et en rose le spectre des OLED réalisées à partir du matériau luminescent Alq3. La largeur spectrale d'émission de ces cavités reste donc importante et est de l'ordre de 150 nm.

Le spectre d'émission de sources OLED simples est donc large et peut nuire aux performances de l'instrument développé au laboratoire (voir § 2.3.2). La réduction de l'intervalle spectral de ce type de source en vue de leur intégration dans le composant de l'instrument est donc nécessaire.

Enfin, nous avons cherché à simuler le spectre d'émission de la marche 1 des échantillons réalisés au LPCML et LPMCn. Pour cela nous avons simulé le spectre d'émission de la cavité décrite sur la Figure 3.36 en faisant varier l'épaisseur du milieu 3 (milieu où sont situés les dipôles) afin d'ajuster la simulation aux mesures. Nous obtenons le spectre suivant pour une cavité d'épaisseur 131,9 nm :

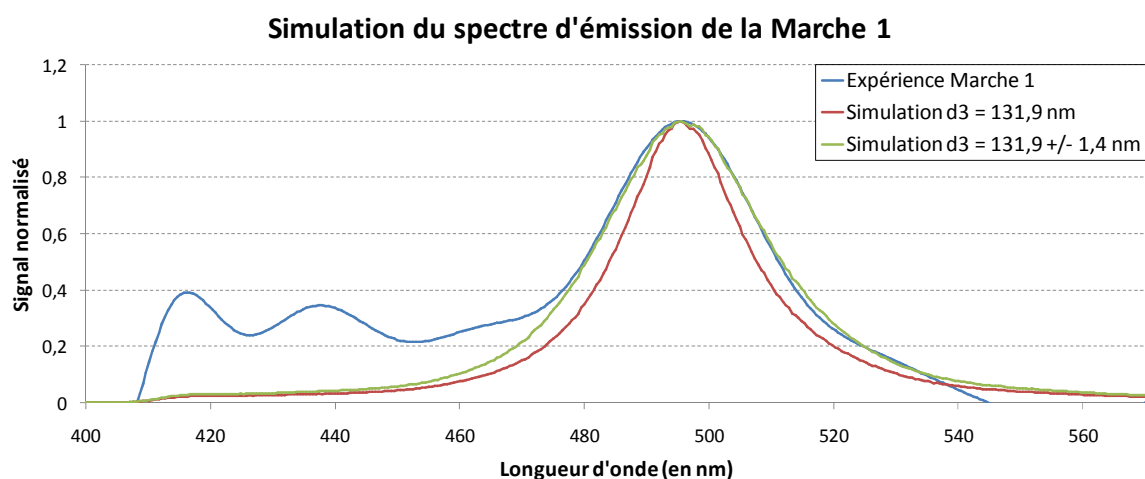


Figure 3.47. Simulation du spectre d'émission de la marche 1 pour une émission normale à la cavité. Le spectre simulé est celui d'une cavité de 131,9 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction de 1,9 ainsi que celui d'une cavité dont l'épaisseur suit une loi gaussienne autour de la valeur $d_3 = 131,9$ nm avec un écart type de 1,4 nm.

On calcule donc qu'une cavité de 131,9 nm permet de simuler le spectre d'émission de la marche 1 de nos échantillons. On retrouve ainsi la valeur de l'épaisseur théorique de la cavité que nous avons cherché à réaliser.

Toutefois, on remarque que le spectre simulé est moins large que celui mesuré. Cela peut s'expliquer par une certaine rugosité de la couche active déposée à l'intérieur de la cavité. En effet, une telle rugosité aurait pour effet d'élargir le pic d'émission de la cavité du fait d'une épaisseur de cavité variable autour de sa valeur moyenne $d_3 = 131,9$ nm. En simulant cette rugosité à l'aide d'une distribution gaussienne d'écart type de 1,4 nm de l'épaisseur autour de sa valeur moyenne d_3 , on remarque qu'il est possible de retrouver la largeur du pic d'émission de la cavité. Une telle hypothèse est donc plausible.

Cette hypothèse est confirmée par les travaux de S. Rabaste (Rabaste 2003) qui a caractérisé la rugosité de couches de TiO_2 déposées par Dip coating. Il alors montré que ces couches ainsi déposées ont une rugosité de l'ordre de 1 nm rms, ordre de grandeur que l'on retrouve sur notre simulation.

Enfin, on remarque la présence de signal dans le domaine 410 – 460 nm que nous ne simulons pas à l'aide de notre modèle. Nous donnerons dans le paragraphe suivant une hypothèse pour expliquer la présence de ce signal. Cependant, cette hypothèse n'a pas pu être confirmée expérimentalement.

3.4.3.3. Influence de l'épaisseur de la cavité

Elle est de deux natures. L'épaisseur de la cavité va, d'une part, déterminer le nombre de modes émis par la cavité et, d'autre part, permettre d'ajuster la longueur d'onde d'émission de ces modes.

Plus l'épaisseur de la cavité est importante, et plus l'intervalle spectral entre deux résonances de la cavité sera faible. Il est alors possible de réaliser des cavités pour lesquelles une ou plusieurs résonances se situent dans le domaine spectral d'émission des dipôles situés dans la cavité créant des sources de lumières émettant une ou plusieurs longueurs d'onde distinctes :

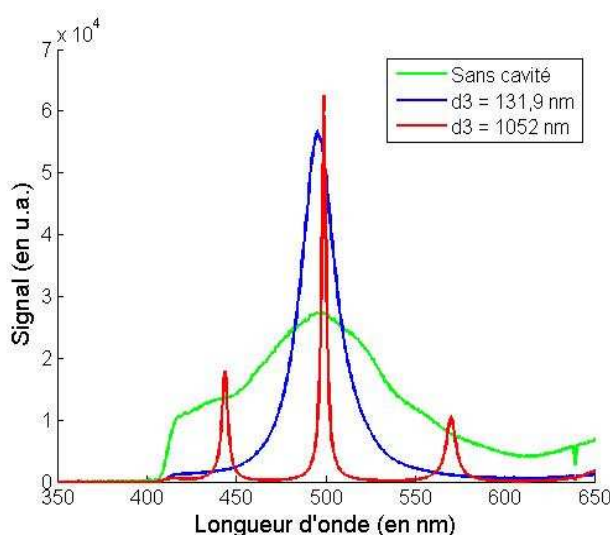


Figure 3.48. Simulation des spectres d'émission de la cavité représentée à la Figure 3.36 pour une épaisseur $d_3 = 131,9$ nm et $d_3 = 1052$ nm et une émission normale. Plus la cavité est épaisse et plus un nombre important de résonances peuvent se trouver dans le domaine d'émission des dipôles situés à l'intérieur de cette dernière.

Cela est par exemple utilisé pour réaliser des sources blanches à l'aide du même matériau émetteur en mixant trois couleurs d'émission : le bleu, le vert et le rouge (Dodabalapur 1996). Cependant, afin d'avoir un meilleur rendement, les sources blanches sont généralement réalisées à l'aide de plusieurs matériaux ou dopants de

couleurs différentes (Kanno 2005, Jou 2006, Cheng 2006).

Pour notre application, une seule longueur d'onde d'émission est nécessaire, c'est pourquoi nous avons cherché à minimiser l'épaisseur de la cavité et choisi de réaliser des couches lumineuses d'environ 130 nm d'épaisseur.

L'épaisseur de la cavité permet aussi d'ajuster la position du pic d'émission de cette dernière. En effet, suivant cette épaisseur, la relation de résonance $m_c \lambda = 2.L(\lambda)$, et donc la longueur d'onde d'émission de la cavité varie. Ainsi, on observe un décalage vers le rouge de l'émission lorsque l'on augmente l'épaisseur de la cavité et inversement si on la diminue :

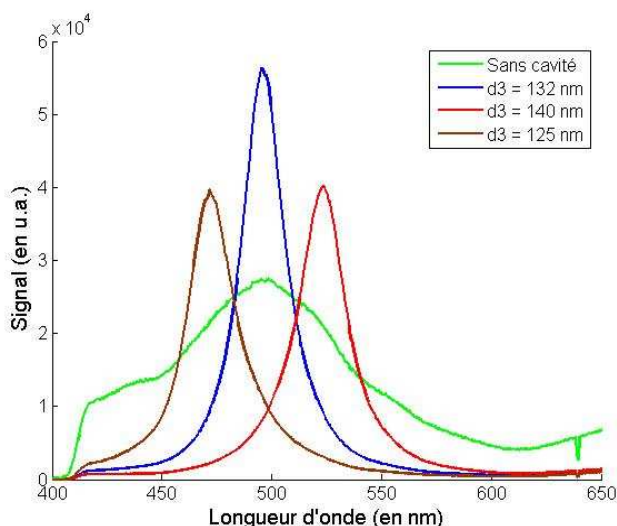


Figure 3.49. Influence de l'épaisseur de la cavité sur la position du pic de résonance et donc de la couleur d'émission de la cavité. Ces simulations ont été réalisées pour la cavité représentée sur la Figure 3.36, une émission normale et les épaisseurs de cavités $d_3 = 132, 125$ et 140 nm.

L'hypothèse pour expliquer la présence de signal entre 410 et 460 nm sur les spectres mesurés peut alors être la présence de trous dans la couche lumineuse, c'est-à-dire d'inhomogénéités dans l'épaisseur de la couche. En effet, en considérant une distribution d'épaisseur de la cavité comprise entre 120 et 132 nm, il est possible de simuler ce signal. Cependant, il nous a été impossible de confirmer cette hypothèse, c'est pourquoi nous ne la développerons pas ici.

Le décalage du pic d'émission avec l'épaisseur de la cavité a pu être caractérisé expérimentalement grâce aux échantillons réalisés au LPCML et LPMC. En effet, les marches réalisées à l'aide d'une couche neutre ont permis de faire varier l'épaisseur de la cavité de l'ordre de 5 nm par marche. On mesure ainsi :

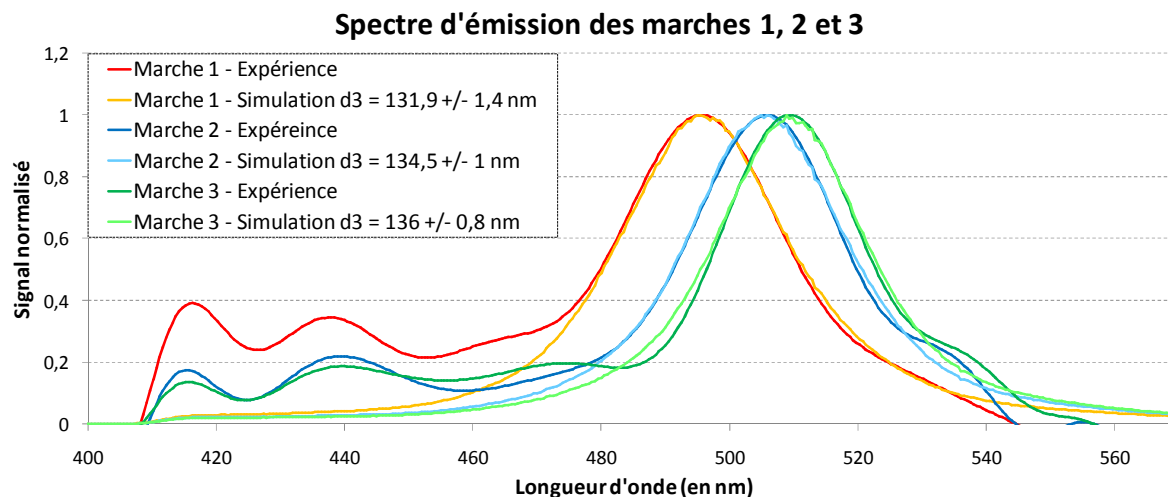


Figure 3.50. Spectres d'émission mesurés et simulés des trois marches des échantillons réalisés au LPCML et LPMCN pour une émission normale à la cavité.

On observe bien que, plus la cavité est épaisse, et plus son pic d'émission est décalé vers le rouge. Il est, par ailleurs, possible de simuler ce décalage en augmentant l'épaisseur de la cavité de quelques nanomètres.

D'autre part, on remarque à nouveau une réduction de l'intervalle spectral d'émission pour ces trois marches par rapport à l'intervalle spectral d'émission de la couche luminescente sans cavité.

	Pic d'émission		Epaisseur de la cavité simulée (en nm)
	Longueur d'onde centrale (en nm)	Largeur spectrale à mi- hauteur (en nm)	
Marche 1	495,9	31,3	131,9
Marche 2	505,9	28,3	134,5
Marche 3	509,4	26,3	136
Sans cavité	500	200	

Table 3.4 Longueur d'onde centrale d'émission et largeur spectrale à mi-hauteur des résonances ainsi que les épaisseurs simulées des marches 1, 2 et 3 des échantillons réalisés au LPCML et LPMCN.

En jouant sur l'épaisseur de la cavité, il est donc possible d'adapter la longueur d'onde centrale de la source au domaine spectral voulu, par exemple au domaine d'absorption des fluorophores utilisés dans le protocole biologique.

3.4.3.4. Influence de l'angle d'émission

Enfin, nous avons caractérisé les effets de l'angle d'émission sur le spectre de la cavité.

La théorie nous dit que pour satisfaire la relation de dispersion de la cavité Fabry Pérot, la longueur d'onde d'émission est décalée vers le bleu avec l'angle d'émission. En effet, pour un angle d'émission interne de θ_3 la longueur optique de la cavité devient $L'(\lambda) = L(\lambda) \cdot \cos\theta_3$. Ainsi, on doit observer un décalage de l'émission vers le bleu en $\cos\theta_3$ avec l'angle d'émission de la cavité :

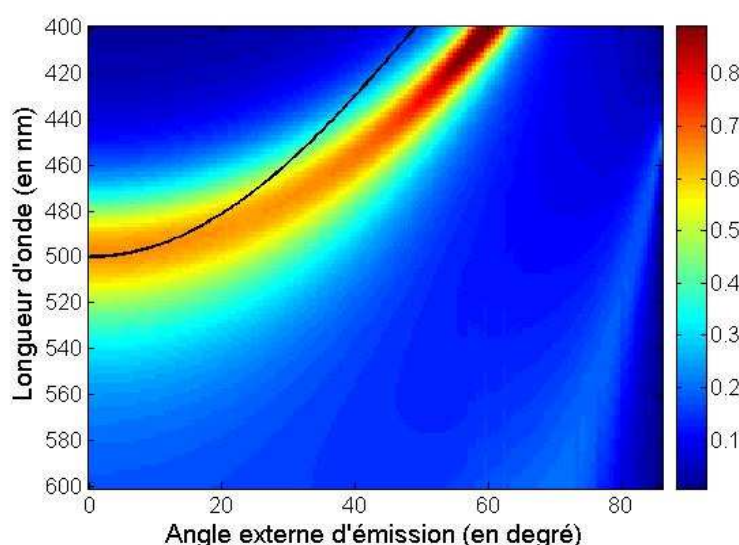


Figure 3.51. Diagramme d'émission simulé de la marche 1 ($d_3 = 131,9$ nm) en fonction de la longueur d'onde d'émission. En noir est représentée la variation de la longueur d'onde en cosinus de l'angle interne, i.e. en $\cos\theta_3$.

On remarque donc bien le décalage vers le bleu de l'émission. Cependant, ce décalage ne suit pas tout à fait la loi en $\cos\theta_3$ comme initialement attendu. Cela peut provenir des variations des longueurs de pénétration dans le miroir de Bragg et le miroir métallique qui ne suit pas exactement une loi en $\cos\theta_3$ contrairement à une cavité Fabry Pérot composée de miroirs parfaits.

De nombreuses équipes travaillant sur les cavités ont mis en évidence expérimentalement ce phénomène (Takada 1993, Dodabalapur 1994 a, Fisher 1995, Dodabalapur 1996, Dirr 1997, Sun 2005) et ont montré qu'il était d'autant plus important que la différence entre la position du pic de résonance à 0° et le pic d'émission sans cavité est grande (Sun 2005).

Ce décalage vers le bleu avec la direction d'émission est un paramètre important dans notre configuration et peut éventuellement permettre de relâcher certaines contraintes sur la directivité et le filtrage de ces sources :

- en positionnant la résonance de la cavité à 0° au niveau du début du spectre d'absorption des fluorophores, les directions d'émission pouvant exciter les plots voisins seront hors du spectre d'absorption des fluorophores car décalées vers le bleu. Ce signal d'excitation ne pourra alors pas exciter les plots voisins, ce qui réduit les contraintes de directivité dues au phénomène de diaphotie, c'est-à-dire d'excitation de plusieurs plots à l'aide d'une seule source d'excitation,
- les directions d'émission de l'OLED pouvant être couplées par réflexion totale dans la lame de verre sont celles émises avec un angle important (supérieur à l'angle limite de réflexion totale) et sont donc fortement décalées vers le bleu. Elles pourront alors être plus facilement filtrées par les filtres utilisés en bout de lame par rapport au cas d'une OLED sans cavité ou le spectre de l'émission couplée dans la lame est plus proche, voire chevauchant, le spectre d'émission des fluorophores utilisés.

Il est par ailleurs possible de limiter ce décalage vers le bleu de la longueur d'onde de résonance avec l'angle d'émission. Tokito et al. (Tokito 1996) a montré qu'en positionnant la longueur d'onde de résonance de la cavité à 0° vers les plus basses longueurs d'onde de la couche luminescente, il était possible de s'affranchir de la

dispersion angulaire des modes (c'est-à-dire des longueurs d'onde) de la cavité. En effet, le décalage vers le bleu de l'émission est dans ce cas limité par les longueurs d'onde possibles d'émission de la couche lumineuse à l'intérieur de la cavité. Il obtient ainsi une OLED possédant une bonne directivité et un spectre étroit (12 nm) sans dispersion des longueurs d'onde plus courtes de la couche lumineuse avec l'angle d'émission. Cela peut être une solution intéressante afin d'obtenir des sources directives et étroites spectralement.

La caractérisation expérimentale de nos échantillons montre le décalage vers le bleu suivant en fonction de l'angle d'émission :

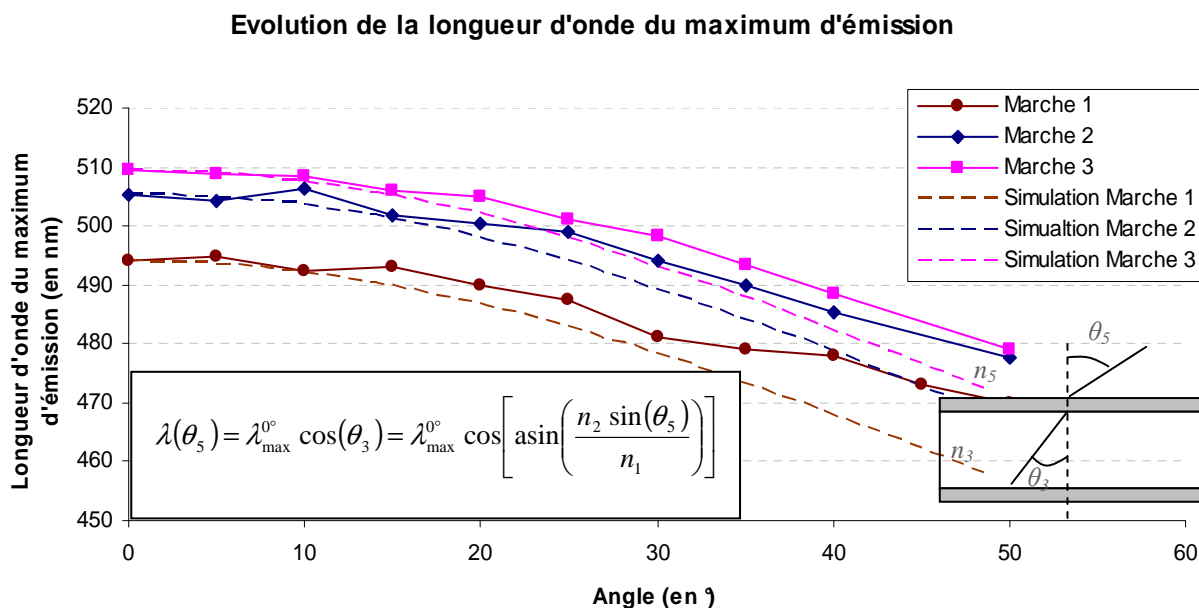


Figure 3.52. Evolution de la longueur d'onde maximale d'émission avec l'angle d'émission de la cavité. Est aussi représentée la formule théorique permettant de suivre cette évolution avec un schéma de la cavité indiquant les notations utilisées. λ_{\max}^0 représente la longueur d'onde maximale d'émission pour une émission normale à la cavité ($\theta_5 = 0^\circ$).

Nous observons donc bien ce décalage vers le bleu de l'émission de la source. Cependant, on remarque à nouveau que ce décalage est moins important qu'attendu par la loi en $\cos\theta_3$. De même, le décalage mesuré est moins important que celui simulé sur la Figure 3.51. Les modèles nous permettent donc de prédire ce décalage vers le bleu, mais il le surestime par rapport à nos données expérimentales. Nous retrouvons, toutefois, que ce décalage vers le bleu dépend de la position relative de la résonance de la cavité à 0° par rapport au pic d'émission de la couche lumineuse sans cavité : plus la résonance est éloignée de la longueur d'onde centrale d'émission de la couche, et plus le décalage vers le bleu est important (Sun 2005).

En traçant les spectres d'émission mesurés en fonction de l'angle d'émission on remarque par ailleurs :

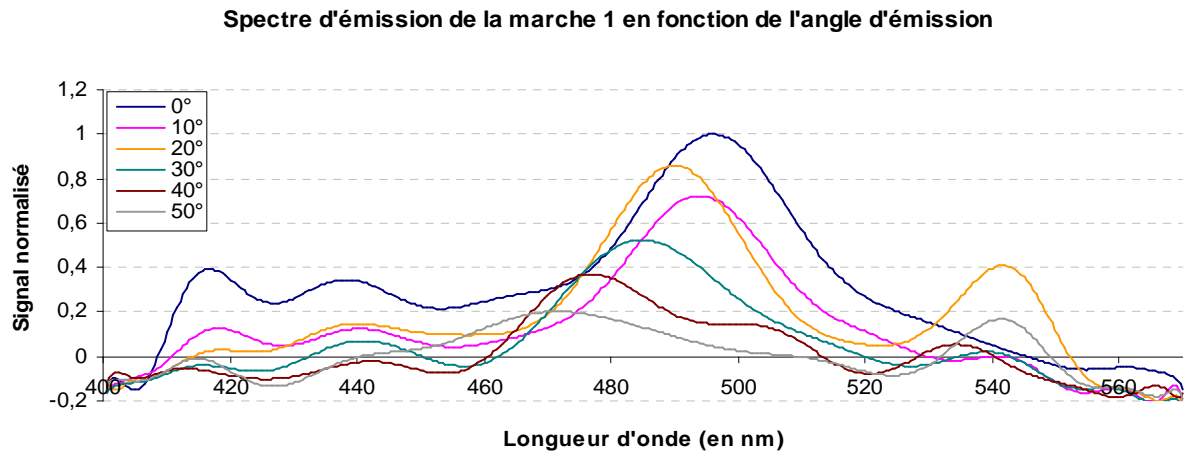


Figure 3.53. Spectres d'émission en fonction de l'angle d'émission de la marche 1.

- l'élargissement spectral de la résonance avec l'angle d'émission. En effet, plus l'angle d'émission est important et plus le coefficient de réflexion du miroir de Bragg diminue entraînant alors une diminution de la finesse de la cavité et donc un élargissement spectral des résonances de la cavité,
- l'apparition de nouvelles résonances au niveau des longueurs d'ondes les plus grandes du spectre d'émission de la couche luminescente sans cavité. Ces résonances correspondent à des résonances hors du spectre de la couche luminescente pour une émission à 0° et, du fait du décalage vers le bleu des résonances de la cavité avec l'angle d'émission, elles se retrouvent à l'intérieur du spectre de la couche luminescente sans cavité pour des angles d'émission importants. Ces résonances peuvent alors être observées sur le spectre d'émission de ces cavités.

En conclusion, les modèles nous permettent de bien simuler le spectre d'émission de nos cavités pour des angles d'émission inférieur à 20° , mais surestiment le décalage vers le bleu pour des angles d'émission plus importants.

3.4.4. Amélioration de la directivité

Intéressons nous enfin aux effets d'une cavité Fabry Péroth sur les propriétés spatiales d'émission d'une couche luminescente.

3.4.4.1. Influence de l'épaisseur de la cavité

L'épaisseur de la cavité, en relation avec les propriétés spectrales de la couche émettrice, va permettre de :

- déterminer le nombre de modes extrait de la cavité. Plus cette dernière est épaisse est plus un nombre important de modes pourront être extraits de la cavité,
- ajuster l'angle d'émission des résonances de la cavité.

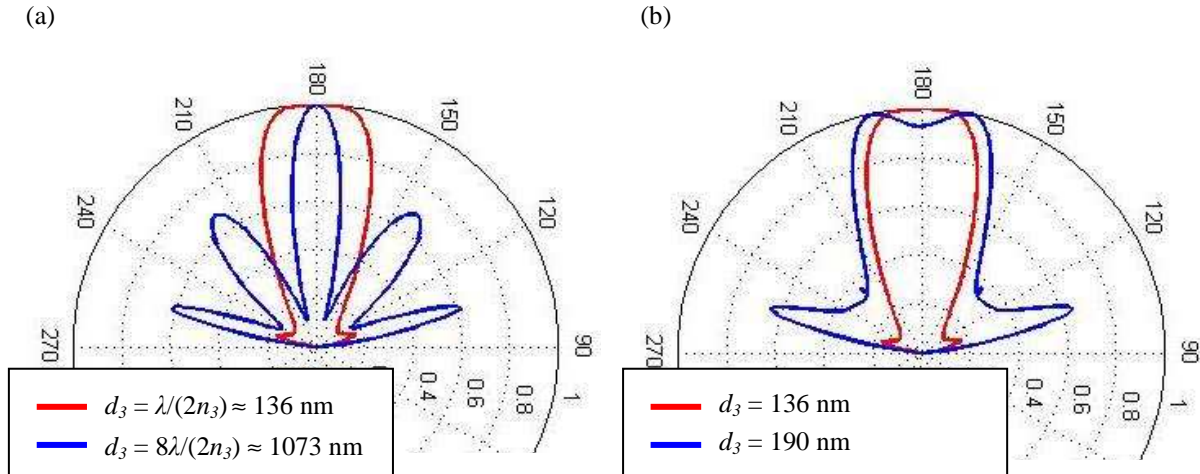


Figure 3.54. Diagrammes d'émission normalisés en coordonnées polaires de la cavité décrit sur la Figure 3.36 pour différentes épaisseurs de cavité et une longueur d'onde d'émission de $\lambda_{em} = 510$ nm.

On remarque que :

- suivant l'épaisseur de la cavité, il sera possible d'avoir une émission normale à la cavité (ici pour $d_3 = 136$ nm) ou bien une émission centrée sur une direction donnée. En effet, suivant l'épaisseur de la cavité, la position des modes de résonance dans l'espace de Fourier, c'est-à-dire la direction d'émission de ces modes, varie,
- pour une épaisseur donnée, plusieurs résonances sont possibles à la longueur d'onde λ_{em} pour différents angles d'émission θ . Cela est dû au fait que la relation de dispersion de la cavité est satisfaite ici pour deux couples (θ, λ) avec ici $\lambda = \lambda_{em}$ fixe. Ainsi, plus l'épaisseur de la cavité est importante, et plus on observera un nombre important de résonances à la longueur d'onde λ_{em} .

3.4.4.2. Influence de la finesse de la cavité

La finesse de la cavité va permettre d'avoir un diagramme d'émission plus ou moins directif : plus la finesse est importante, et plus les modes de cavités seront resserrés dans une direction donnée.

Ainsi, pour les OLED réalisées par le DIHS qui ne sont pas à l'intérieur d'une cavité Fabry Péro, ce que l'on peut considérer comme étant une cavité de finesse très faible, on mesure le diagramme d'émission suivant :

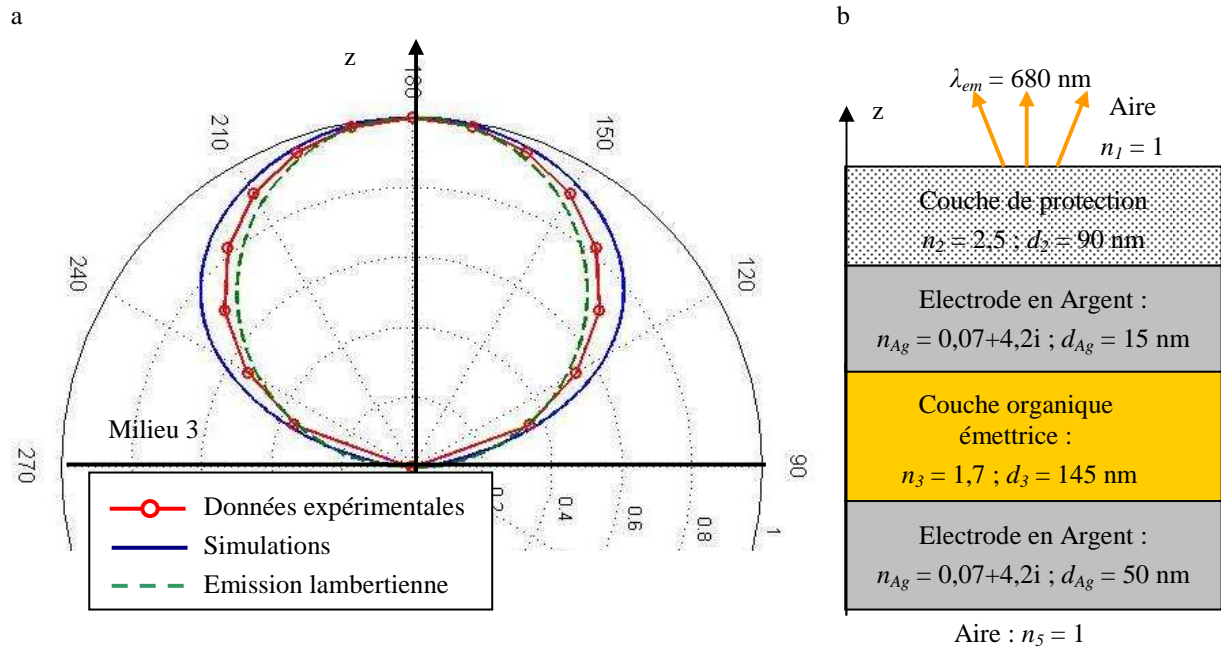


Figure 3.55. (a) : Diagramme d'émission en coordonnées polaires mesuré et simulé de l'OLED à base de dopant rouge réalisée par le DIHS. La longueur d'onde d'émission est ici de 680 nm. (b) : structure de l'OLED réalisée par le DIHS et simulée.

On remarque tout d'abord la relative bonne correspondance entre le diagramme d'émission mesuré et celui simulé. L'émission d'une OLED sans cavité Fabry Pérot peut donc être considérée comme quasi-Lambertienne. Cela confirme le fait qu'il est nécessaire d'améliorer la directivité de ces sources pour les intégrer dans l'instrument développé au laboratoire. En effet, une source ayant cette émission verra une part non négligeable de son énergie couplée dans le composant par réflexion totale, limitant fortement les performances de l'instrument (voir Figure 2.20 (b)).

En utilisant des électrodes métalliques plus épaisses, il serait possible d'augmenter le coefficient de réflexion de ces couches et donc de créer des effets de cavité. Par exemple, une épaisseur d'Argent de 15 nm donne un coefficient de réflexion de l'ordre de 0,65 alors qu'avec une épaisseur de 50 nm on obtient un coefficient de réflexion de 0,967 entre un milieu d'indice de réfraction de 1,7 et un milieu d'indice de réfraction de 1.

Lorsque que l'on place la couche luminescente dans une cavité Fabry Pérot (cas des échantillons du LPCML et LPMCNC), on mesure les diagrammes d'émission suivants. Cette mesure est réalisée en intégrant les spectres d'émission mesurés sur une plage de longueur d'onde donnée. Afin de ne prendre en compte que la longueur d'onde centrale d'émission λ_{em} , on intègre ici sur le domaine spectral $\lambda_{em} \pm 2$ nm.

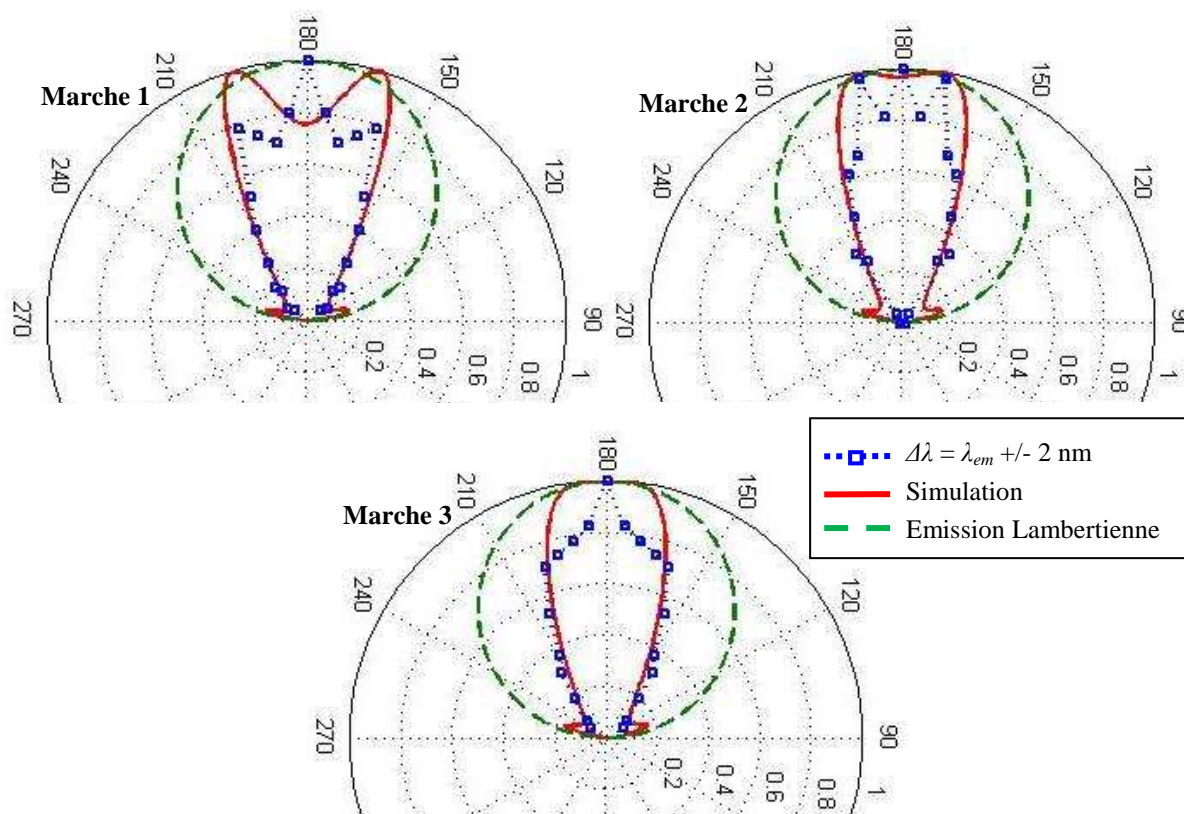


Figure 3.56. Diagrammes d'émission mesurés et simulés des marches 1 2 et 3. Les diagrammes d'émission ont été mesurés pour la longueur d'onde centrale d'émission λ_{em} de ces cavités. Les simulations ont été réalisées pour les épaisseurs et longueur d'onde d'émission données dans la table 3.4. En vert est représentée une émission Lambertienne.

On observe donc sur ces diagrammes d'émission une importante amélioration de la directivité de la source par rapport à une source Lambertienne représentant le diagramme d'émission d'une OLED classique. Les cavités réalisées permettent ainsi d'avoir une émission comprise dans un cône de demi-angle au sommet de 30° . Dans ce cas, très peu de signal d'excitation sera couplé directement dans le composant permettant d'obtenir de bonne limite de détection (voir figure 2.20 (d)). En effet, le diagramme d'émission de la marche 3 est très proche d'un diagramme d'émission en $\cos^5\theta$ utilisé lors de l'étude théorique de l'effet du couplage du signal d'excitation dans la lame sur les performances de l'instrument.

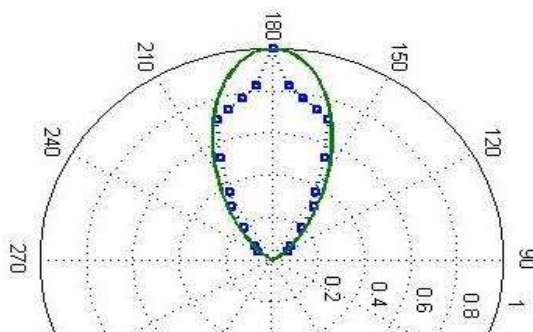


Figure 3.57. Diagramme d'émission de la marche 3 (calculé pour $\Delta\lambda = \lambda_{em} \pm 2 \text{ nm}$) comparé à un diagramme d'émission en $\cos^5\theta$ utilisé pour simuler le diagramme d'émission de sources directives dans le paragraphe 2.3.2.

On observe, par ailleurs, une relativement bonne correspondance entre les diagrammes d'émission simulés à partir du modèle et les données expérimentales.

En effet, pour chacune de trois marches, les diagrammes d'émission obtenus par la simulation et les expériences sont compris dans le même cône d'émission de demi-angle au sommet d'environ 30° . De plus, on retrouve sur les marches 1 et 2 les résonances à 12 et 8° respectivement données par les simulations alors que sur la marche 3 on observe uniquement une résonance pour 0° comme le donne la simulation. Ces résonances sont toutefois moins marquées sur les données expérimentales que sur les simulations. Une hypothèse est qu'elles sont atténuées par une surestimation du signal à 0° du fait de la contribution du signal d'excitation pour les faibles angles d'émission (la diode d'excitation a une émission dans un cône de demi-angle au sommet de 10°).

On peut donc estimer que le modèle que nous avons utilisé permet de bien rendre compte des propriétés spatiales d'émission de cavité. Cela pourra alors nous permettre dans des travaux futurs de dimensionner des cavités plus facilement et d'étudier théoriquement les effets de telle ou telle cavité sur les propriétés d'émission de dipôles en vue de l'intégration de ce type de sources dans notre instrument.

3.4.4.3. Dispersion angulaire des modes de la cavité

Enfin, nous avons évoqué au paragraphe 3.4.2 la dispersion angulaire des différents modes de la cavité lorsque la finesse de cette dernière devient trop importante vis-à-vis de la largeur spectrale des dipôles situés à l'intérieur de la cavité. En effet, le diagramme d'émission d'une cavité dépend aussi de sa longueur d'onde d'émission. Afin de satisfaire les conditions de résonnances de la cavité pour différentes longueurs d'onde, l'angle d'émission de ces longueurs d'onde varie :

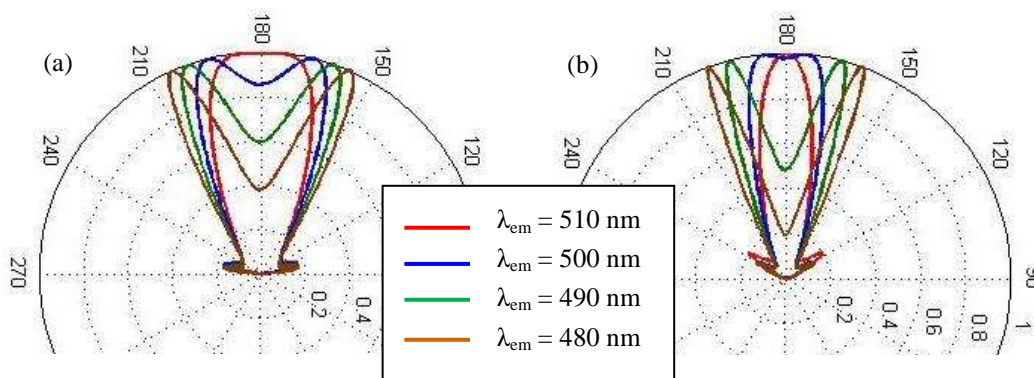


Figure 3.58. Evolution du diagramme d'émission simulé de la marche 3 pour différentes longueurs d'onde d'émission : 480, 490, 500 et 510 nm. Le diagramme d'émission (a) correspond à un miroir de Bragg de 3,5 paires de couches et le diagramme d'émission (b) correspond à un miroir de Bragg de 4,5 paires de couches.

Plus la finesse de la cavité est importante et plus les effets chromatiques seront importants car chaque mode sera resserré dans une direction donnée. Cet effet sera d'autant plus gênant que le spectre d'émission de la couche luminescente est large. En effet, plus de longueurs d'onde pourront être excitées et donc être dispersées angulairement par la cavité. De plus, chaque longueur d'onde n'excite pas de la même manière un fluorophore donnée. Pour que chaque événement de reconnaissance moléculaire sur un plot biologique donné contribue de la même manière au signal de fluorescence, il est donc nécessaire d'avoir une source d'excitation ayant un spectre d'émission invariable avec l'angle d'émission. Il nous faut donc minimiser cette dispersion angulaire des longueurs d'onde d'excitation pour nos applications.

Ce problème se pose pour les OLED qui ont un spectre d'émission large (voir Figure 3.43 et Figure 3.46). En effet, on mesure un décalage vers le bleu non négligeable de l'émission des échantillons réalisés au LPCML et LPMCNC ce qui équivaut à une dispersion angulaire des différentes longueurs d'onde de la couche luminescente.

Afin d'avoir un diagramme d'émission le plus directif possible et ce sans dispersion angulaire des différentes résonances de la cavité, il est donc nécessaire de choisir une couche luminescente présentant le spectre d'émission le plus étroit possible.

3.4.5. Effet d'une cavité Fabry Péroth sur les propriétés d'émission d'une OLED – Conclusions

La réalisation d'OLED par le département DIHS du CEA-Grenoble nous a, dans un premier temps, permis :

- de tester le fonctionnement d'OLED pompées électriquement et de réaliser un démonstrateur de sources sur substrat en verre pour le projet,
- d'illustrer le besoin de réduire la largeur spectrale d'émission et d'améliorer la directivité de ces sources en vue de leur utilisation pour le projet.

Les mesures effectuées sur les cavités Fabry Péroth réalisées au LPCML et LPMCNC nous ont ensuite permis de caractériser les effets d'une telle cavité sur l'émission d'OLED :

- la réduction de la largeur spectrale d'émission en fonction de la finesse de la cavité,
- l'ajustement possible de la longueur d'onde d'émission avec l'épaisseur de la cavité,
- l'amélioration de la directivité de la source en fonction de la finesse de la cavité,
- le décalage vers le bleu du spectre de la source en fonction de l'angle de l'angle d'émission.

Ces cavités ne nous ont cependant pas permis de caractériser une augmentation du signal à l'intérieur de leurs résonances, effet important d'une cavité Fabry Péroth sur les propriétés d'émission de dipôles. En effet, la fragilité des couches déposées et leur trop faible rendement ne nous ont pas permis d'effectuer des mesures quantitatives entre les différents échantillons testés avec et sans cavité.

La bonne correspondance de ces mesures avec les simulations réalisées à partir des modèles décrits au chapitre 2 nous permet de valider une approche théorique de l'étude des performances de l'instrument développé au laboratoire en fonction des caractéristiques optiques d'une cavité Fabry Péroth simulées par ces modèles. Nous allons donc, dans le paragraphe suivant, regarder si les propriétés des cavités Fabry Péroth réalisées au LPCML et LPMCNC peuvent être intégrées à l'instrument sans en détériorer les performances.

3.4.5.1. Analyse des propriétés des cavités réalisées sur les performances de l'instrument

Pour cette analyse, nous reprenons le travail présenté au paragraphe 2.3.2 et insérons dans nos calculs les propriétés des cavités que nous avons mesurées.

Tout d'abord regardons l'effet de la directivité des cavités réalisées au LPCML et LPMCNC sur les performances de détection de notre instrument du fait de l'éclairage direct du détecteur par la source d'excitation (voir § 2.3.2.4).

Considérons les diagrammes d'émission simulés des marches 1, 2 et 3 de nos échantillons et calculons le

coefficient γ définit par l'équation 2.14 :

	Marche 1	Marche 2	Marche 3	$\cos^5\theta$
Coefficient γ	0,0915	0,0914	0,0918	0,0038

Table 3.5 Coefficient gamma calculé pour les diagrammes d'émission simulés des trois marches des échantillons réalisés par le LPCML et le LPMC et pour un diagramme d'émission en $\cos^5\theta$.

On remarque que ce coefficient est bien plus important pour les diagrammes d'émission des cavités que nous avons caractérisées par rapport à celui d'un diagramme d'émission suivant la loi $\cos^5\theta$. En effet, les diagrammes d'émission des marches 1, 2 et 3 ont une résonance vers 75° ce qui entraîne qu'une part bien plus importante de signal est couplée par réflexion totale dans la lame par rapport à une source dont le diagramme d'émission suit la loi $\cos^5\theta$.

Pour une source ayant un diagramme d'émission identique à celui de la marche 1 et ayant un spectre d'émission d'une OLED basée sur le matériau Alq₃ (voir Figure 2.17 b), il est alors nécessaire de filtrer en émission et en excitation avec des taux de réjection supérieur à 10^{-6} afin d'obtenir des performances de détection de 1 molécule/ μm^2 :

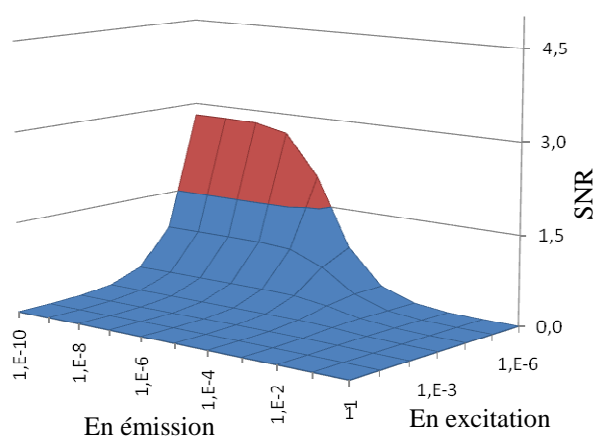


Figure 3.59. Rapport signal sur bruit (SNR) obtenu à l'aide du diagramme d'émission de la marche 1 et ce suivant le taux de réjection du filtrage utilisé en émission et en excitation pour une détection de 1 molécule/ μm^2 .

On remarque que les diagrammes d'émission des cavités Fabry Péro qui nous avons caractérisées ne sont pas suffisamment directifs pour avoir de bonnes performances sur l'instrument développé au laboratoire. En effet, leur résonance vers 75° nuit fortement aux performances de l'instrument. Il est donc nécessaire de réaliser des cavités n'ayant pas de résonances pour des angles supérieurs à l'angle limite de réflexion totale à l'intérieur de la lame de verre.

Pour la même cavité que la marche 1 mais composée d'un miroir de Bragg constitué de 4,5 paires de couches, on trouve cette fois :

(a)

(b)

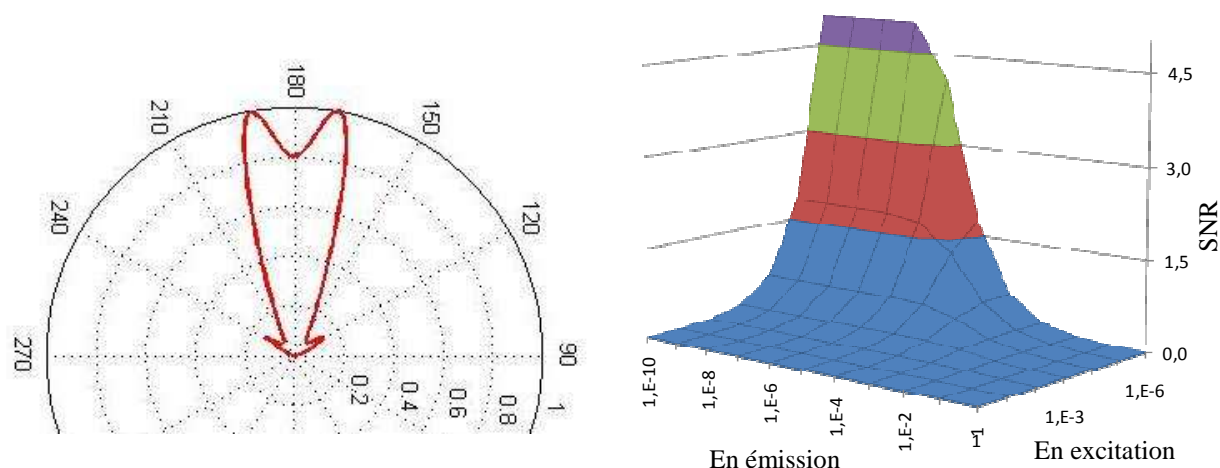


Figure 3.60. (a) : Diagramme d'émission d'une cavité identique à la marche 1 mais composé d'un miroir de Bragg constitué de 4,5 paire de couches de haut et bas indice de réfraction. (b) : Rapport signal sur bruit SNR obtenu à l'aide de ce diagramme d'émission et ce suivant le taux de réjection du filtrage utilisé en émission et en excitation pour une détection de 1 molécule/ μm^2 .

Une telle cavité permettrait donc de relâcher quelque peu les contraintes de filtrage en émission et en excitation et nécessiterait des taux de réjection de l'ordre de 10^{-5} . Cependant la résonnance vers 60° nuit toujours aux performances de l'instrument. Les filtres utilisés actuellement en émission, d'un taux de réjection de 10^{-6} pourraient toutefois suffire, et il faudrait réduire suffisamment l'intervalle spectral d'émission de la source pour avoir l'équivalent d'un taux de réjection en excitation de 10^{-5} .

Au niveau de la réduction de l'intervalle spectral des sources par les cavités Fabry Pérot, il est plus difficile de quantifier le gain. En effet, il aurait fallu réaliser des sources dont le spectre d'émission permet d'exciter les fluorophores Cy3 utilisés dans l'instrument afin de pouvoir le comparer avec les filtres actuellement utilisés. De plus, les mesures que nous avons effectuées sont trop bruitées pour pouvoir évaluer le taux de réjection de la cavité dans un domaine spectral donné, c'est-à-dire représentant le domaine de transmission d'un filtre en émission ou en excitation. Nous pouvons cependant dire qu'il sera nécessaire de réaliser des cavités les plus planes possibles afin d'éviter tout élargissement de spectre et la présence de signal hors de la résonnance principale de la cavité comme c'est le cas sur nos échantillons.

Enfin, nous n'avons pas eu le temps d'évaluer l'influence de la dispersion angulaire des modes de la cavité sur les performances de l'instrument. Toutefois, étant donnée que cette dispersion nuit à la directivité globale de la source, nous pouvons déjà dire qu'il sera nécessaire de trouver des matériaux luminescents ayant le spectre le plus étroit possible afin de limiter au maximum cette dispersion.

Conclusions générales

Le travail présenté dans ce mémoire s'est articulé autour du domaine des biocapteurs à fluorescence pour la détection d'agents pathogènes hors laboratoire. A partir d'un instrument développé au laboratoire, le travail de thèse a consisté à rechercher les possibilités de miniaturisation du dispositif par l'étude des possibilités d'intégrer les sources d'excitation directement dans le composant de l'instrument. Pour cela, les sources organiques de type OLED, de par leurs avantages vis-à-vis des sources inorganiques, ont été choisies pour être intégrées.

Toutefois, une étude théorique des performances de l'instrument en fonction des propriétés spectrales et spatiales d'émission des sources OLED a montré qu'il était nécessaire de modifier leurs propriétés d'émission afin d'atteindre des sensibilités de détection acceptables pour les applications visées. De plus, la configuration de l'instrument utilisant le composant comme collecteur du signal de fluorescence nous a poussé à étudier les interactions en champ proche d'un fluorophore avec un milieu stratifié afin de définir une structure permettant l'intégration des sources d'excitation et la collecte du signal dans le même composant.

Le travail de thèse a donc consisté à étudier les propriétés d'émission d'un dipôle en fonction de son environnement afin de définir des structures permettant l'intégration de sources d'excitation de type OLED et la collecte du signal de fluorescence dans le même composant. Une structure commune, la cavité asymétrique, a alors été définie afin de pouvoir modéliser à la fois les propriétés d'émission de sources OLED ainsi que le phénomène de couplage de la fluorescence dans le composant. A partir de travaux présentés dans la littérature, nous avons donc développé plusieurs modèles théoriques permettant de modéliser l'émission de dipôles situés à l'intérieur d'une cavité asymétriques quelconque et d'en connaître les différentes voies de relaxation de l'énergie.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les effets d'une couche mince de fort indice de réfraction sur la collecte de la fluorescence dans le composant. En effet, plusieurs équipes utilisent de telles couches afin de collecter le signal de différents plots biologiques et le guider en bout de composant vers un détecteur résolu spatialement. L'utilisation d'une telle couche nous a donc paru être une solution afin de confiner le signal de fluorescence en surface de composant et ainsi éviter les interactions avec les structures des sources intégrées sur la face opposée.

Bien que les modèles théoriques nous ont permis de montrer qu'une telle couche permettait de créer de nouvelles voies de relaxation de l'énergie pour les dipôles situés à l'interface du composant, nous avons calculé que très peu d'énergie pouvait y être confinée en comparaison de celle couplée dans le guide épais. La réalisation de plusieurs lames de verre possédant une couche mince de fort indice de réfraction à leur surface nous a ensuite

permis de caractériser expérimentalement les effets d'une telle couche mince et de confirmer nos résultats théoriques. Nous avons ainsi montré que suivant l'épaisseur optique de cette couche, il est possible d'améliorer la quantité de signal couplé dans le composant tout en réduisant le volume de mesure et donc la contribution des signaux non spécifiques provenant du volume de l'échantillon testé. Une couche mince de Nitrure de Silicium de 200 nm d'épaisseur et d'indice de réfraction de 2,2 nous a par exemple permis d'améliorer d'un facteur deux le rapport signal sur bruit en bout de lame.

Les expériences en champ proche réalisées sur ces lames ont confirmé que très peu de signal était confiné dans les couches minces. Ce résultat, important pour le domaine des biocapteurs, montre que les instruments utilisant des guides d'onde afin de collecter le signal de fluorescence des plots biologiques ne peuvent atteindre de bonnes performances. En effet, très peu de signal spécifique est, d'une part, collecté par ces guides d'onde et, d'autre part, le signal couplé dans l'ensemble de la lame détériore fortement le contraste en bout de lame nuisant ainsi au rapport signal sur bruit de l'instrument. Cela nous a donc permis de conforter l'intérêt de la configuration de l'instrument développé au laboratoire qui détecte l'ensemble des signaux couplés dans la couche mince et dans le composant et qui utilise un balayage discret des différents plots biologiques afin de dissocier leur signal.

Une suite intéressante à ces travaux serait de tester d'autres types de couches minces de caractéristiques optiques proches de celles du Nitrure de Silicium mais présentant une autofluorescence plus faible afin de diminuer encore le bruit sur les mesures. Une couche de Ta_2O_5 pourrait être un candidat intéressant. Par ailleurs, la recherche d'une chimie de greffage adaptée à ces matériaux doit aussi être menée afin d'avoir les mêmes performances pour les réactions biologiques que sur du verre simple pour lequel la chimie de greffage est optimisée. Une étude plus poussée de la dépendance du couplage de la fluorescence selon l'altitude des dipôles pourrait aussi apporter des informations importantes et comprendre les différences existantes entre les données expérimentales et théoriques que nous avons observées. Enfin, une couche mince de fort indice de réfraction ne permettant pas de confiner le signal en surface de composant, une autre solution doit être trouvée afin de limiter les interactions entre le signal de fluorescence et les structures des sources intégrées dans la face opposée du composant.

La seconde partie du travail présenté dans ce mémoire a consisté à rechercher des solutions afin d'intégrer les sources d'excitation dans le composant du biocapteur. Pour cela, les sources organiques, de part leur simplicité structurelle, la possibilité de les réaliser sur des substrats en verre ou plastique, et leurs potentiels faibles coûts de fabrication ont été choisies pour cette intégration. Une étude expérimentale de ces sources couplée à une analyse système de notre chaîne de détection a permis de mettre en avant les optimisations nécessaires de leurs propriétés d'émission pour leur intégration. Une solution basée sur l'utilisation de cavités Fabry Péroต์ afin de contrôler leurs propriétés spectrales et spatiales a alors été proposée. Une série d'expériences et de modélisations sur des sources organiques placées à l'intérieur de cavité Fabry Péroต์ a permis de montrer la faisabilité d'intégrer ce type de sources dans notre instrument grâce aux contrôles de leurs propriétés d'émission. En effet, ces cavités nous ont permis de fortement réduire le spectre d'émission de couches luminescentes organiques ($\Delta\lambda \approx 30$ nm), de faire varier leur longueur d'onde d'émission, et de les rendre directives ($\Delta\theta = 30^\circ$).

Cependant, le spectre large des sources organiques entraîne une dispersion angulaire des résonances de la cavité

qui se caractérise par un décalage vers le bleu avec l'angle d'émission et l'apparition de nouvelles résonances à des longueurs d'ondes plus grandes. Afin de réduire cette dispersion pouvant entraîner un couplage du signal directement dans la lame et donc nuire à la sensibilité du système, il serait donc intéressant de continuer ces travaux sur des sources dont le spectre d'émission est moins large. Pour cela, nous avons identifié des sources dérivant des OLED et dénommées les "QdotLEDs" (Coe 2002), dont le fonctionnement est similaire aux OLED excepté que la couche émettrice est remplacée par des boîtes quantiques émettrices de lumière. Les avantages de ces sources vis-à-vis de notre application sont qu'elles présentent naturellement un spectre étroit et de très bons rendements quantiques. Plusieurs études ont montré que ce type de source située dans des cavités Fabry Péroต์ pouvait permettre de contrôler encore plus finement le spectre d'excitation, d'obtenir de meilleures directivités tout en minimisant la dispersion angulaire des résonances de la cavité, et d'avoir des puissances d'excitation plus importantes qu'avec des OLEDs classiques (Sung 2006, Bulović 2007). Ce type de sources pourrait alors présenter de nombreux avantages pour l'intégration de la détection optique dans les biocapteurs à fluorescence de part leurs propriétés spectrales adaptées aux problèmes inhérents à la détection d'un signal de fluorescence.

Enfin, l'étude des possibilités d'intégrer un détecteur optique directement sur la face de sortie de la lame de verre est une suite envisageable à ce travail de thèse afin de réaliser un dispositif entièrement intégré. Cette intégration pourrait par exemple se faire à l'aide de photodiodes organiques dont le fonctionnement s'apparente au phénomène inverse d'émission de photons par les OLEDs.

En conclusion, cette thèse a permis de conforter l'intérêt de la configuration de l'instrument développé au laboratoire par rapport aux autres dispositifs présentés dans la littérature qui sont généralement moins robustes ou qui présentent des faibles sensibilités de détection. Un balayage discret des différents plots biologiques et la collecte du signal de fluorescence dans le composant semblent en effet être un très bon compromis pour réaliser des dispositifs sensibles, robustes et compacts. De plus, nous avons montré l'intérêt des sources organiques de type OLED pour la miniaturisation des biocapteurs optiques afin de réaliser des dispositifs facilement transportables et utilisables en extérieur. Les nombreux avantages de ces sources et leur maturité technologique en font aujourd'hui des candidates solides pour de nombreuses applications optiques dans le domaine des biotechnologies.

Annexe A. Description des bancs de mesures

Cette annexe a pour but de décrire le matériel et protocoles de mesures utilisés pour les trois bancs de mesure qui ont été mis au point au cours du travail de thèse et dont le principe a été présenté au chapitre 3.

A.1. Le banc microscope

A.1.1. Présentation du banc de mesure

Le banc microscope a pour but de comparer la collecte et le guidage des signaux de fluorescence de plots biologiques suivant le composant sur lesquels ils sont situés.

Il est composé d'une voie de référence permettant de normaliser les niveaux de fluorescence des différents plots, et d'une voie analogue au principe de détection de l'instrument développé au laboratoire :

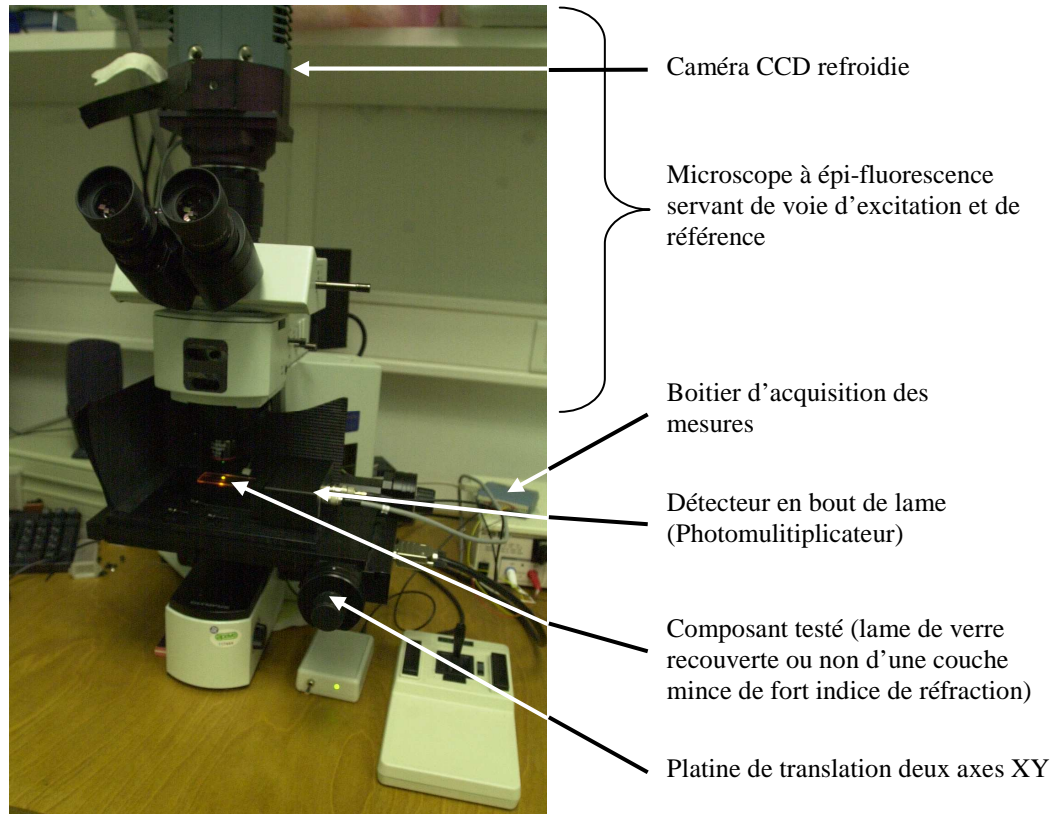


Figure A.1. Photographie du banc de mesure microscope tel qu'il a été monté et utilisé au cours du travail de thèse.

A.1.2. Matériel

Le microscope à épi-fluorescence est réalisé à partir d'un microscope à épi-fluorescence BX51M de chez Olympus et est équipé :

- d'une lampe Halogène (Olympus Optical AXLH100) ou d'une lampe à Mercure HBO100 suivant la puissance du signal d'excitation désirée,
- d'un objectif Olympus x5 (ouvert à 0,15) ou x10 (ouvert à 0,30),
- d'un cube équipé de filtres adaptés aux fluorophores organiques Cy3 (Olympus Cy3 U-M41007A, C10833).
- d'une caméra CCD Andor DV438, avec une carte d'acquisition PCI CCI-010 afin d'acquérir sur un ordinateur les mesures des signaux de fluorescence collectés par le microscope.

Un photomultiplicateur analogique Hamamatsu H8249-10 est placé en bout de lame. La caractérisation de ce détecteur a été réalisée pendant le travail de Diplôme de Recherche Technologique de Damien Du Bouëtiez (Du Bouëtiez 2006) et la relation permettant de remonter au nombre de photo-événements NPhe en fonction de la tension de sortie V_{out} et de la tension de gain V_g appliquée au détecteur est :

$$N_{Phe} = 40V_g^{-7} \cdot V_{out} \quad \text{Eq. A.1.}$$

L'acquisition de la tension de sortie du photomultiplicateur est effectuée grâce à l'utilisation d'un boîtier d'acquisition analogique USB Measurement Computing PMD-1208FS ayant une résolution de 12 bits et une

cadence d'acquisition de 50 kB/s.

Deux filtres d'émission ont été positionnés devant le détecteur afin de filtrer le signal d'excitation. Ces filtres sont un filtre coloré passe-haut OG570 (Schott) et un filtre interférentiel 595AF60 (Omega Optical) centré sur 595 nm et large de 60 nm. Ce sont les deux filtres utilisés habituellement dans l'instrument développé au laboratoire.

Une platine deux axes XY Prior 1600 est utilisée afin de faire varier la position de la lame de verre par rapport au spot d'excitation.

Enfin, une photodiode TAOS (TSL250-R) couplée à une densité optique ($D = 3$) est utilisée pour contrôler la puissance du signal d'excitation au cours des mesures.

Le fonctionnement de ce banc (acquisition des images en épi-fluorescence, acquisition du signal en bout de lame, déplacement de la platine et contrôle de la tension d'excitation) est contrôlé à partir d'un programme écrit dans le langage Visual Basic .6.

Par ailleurs, une étude des incertitudes de mesures a été effectuée sur ce banc et a permis de donner quelques règles de mesures :

- plus nous effectuons un nombre important d'acquisitions par le boîtier USB de la tension du photomultiplicateur et plus l'incertitude sur cette tension diminue. Nous avons par ailleurs montré qu'au delà de 800 acquisitions, le bruit de mesure ne diminue plus. Nous effectuerons donc systématiquement l'acquisition de 800 mesures par le boîtier USB dont on considérera la moyenne pour chaque mesure de la tension du photomultiplicateur.
- afin de s'affranchir de la rémanence du photomultiplicateur utilisé, il est nécessaire de déplacer le spot d'excitation vers une zone non fluorescente entre deux mesures et de limiter l'exposition continue du photomultiplicateur à une source lumineuse,
- l'accélération de la platine de déplacement doit être minimale afin d'avoir une bonne reproductibilité de positionnement.

A.1.3. Protocole de mesure

Le protocole de mesure utilisé a été fait l'objet d'une automatisation sous programme Visual Basic .6. Ce protocole, pour chaque plot fluorescent d'un composant, est le suivant :

- acquisition de 800 mesures de la tension du photomultiplicateur dont on considère par la suite la moyenne et l'écart type,
- acquisition de 5 images en épi-fluorescence,
- acquisition de 800 mesures de la tension de la photodiode contrôlant la stabilité du signal d'excitation,
- acquisition de 800 mesures de la tension du photomultiplicateur pour une position du spot d'excitation juste à côté du plot fluorescent afin de mesurer l'offset sur nos mesures dû au signal d'excitation ou à d'autres sources de lumière parasite (par exemple l'écran d'ordinateur).

L'analyse des images en épi-fluorescence est réalisée avec le logiciel de traitement d'image ImageJ. Cette analyse consiste à définir deux régions d'intérêt entourant la région fluorescente que l'on désire mesurer et une

région non fluorescente à l'intérieur du spot d'excitation représentant l'offset sur nos mesures (voir Figure A.2). L'intégration du signal dans la région d'intérêt 1 corrigée par la moyenne du signal dans la région d'intérêt 2 ramenée au nombre de pixels de la région 1 permet alors d'avoir accès au signal spécifique du plot fluorescent.

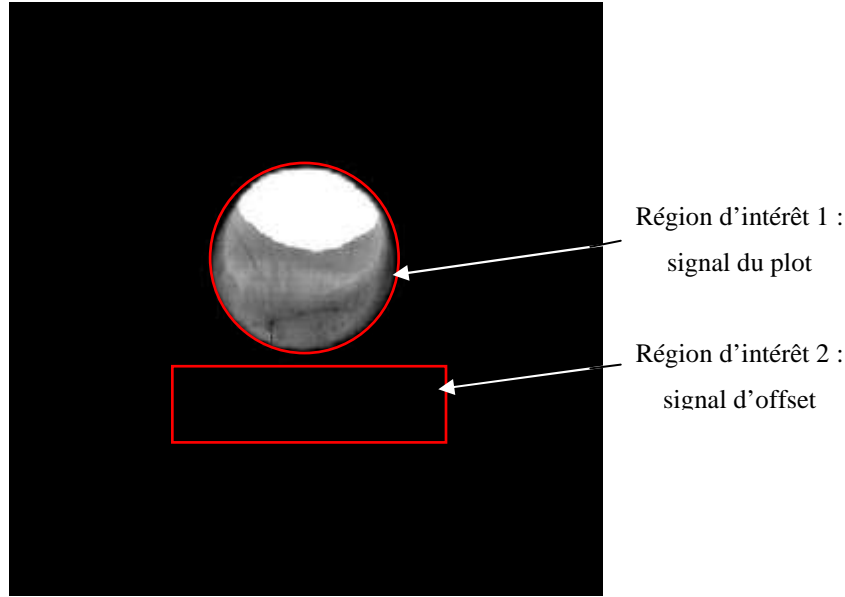


Figure A.2. Image d'un plot fluorescent acquis en épi fluorescence et représentation des régions d'intérêts utilisées pour le calcul du signal de fluorescence et du signal d'offset.

Nous corrigeons alors pour chaque plot fluorescent le signal mesuré en bout de lame suivant la formule :

$$S_i = (M_i^{PM} - O_i^{PM}) \times \frac{S_{ref}^{épi}}{M_i^{épi} - O_i^{épi}} \times \frac{S_{ref}^{exci}}{M_i^{exci}} \quad \text{Eq. A.2.}$$

où S_i représente le signal spécifique du plot i , M_i^{PM} et O_i^{PM} sont les moyennes des 800 mesures de la tension du photomultiplicateur pour le plot fluorescent et l'offset respectivement, $M_i^{épi}$ et $O_i^{épi}$ sont respectivement les signaux de la région d'intérêt 1 et 2 (ramené au nombre de pixels de la région 1) des images acquises en épi-fluorescence, M_i^{exci} le signal moyen d'excitation, et S_{ref}^{exci} et $S_{ref}^{épi}$ sont des valeurs arbitraires prises comme référence pour les signaux d'excitation et d'épi-fluorescence respectivement.

Grâce à ce protocole de mesure et de dépouillement des résultats, il est alors possible de comparer l'efficacité de la collecte de fluorescence et de son guidage de différents composants entre eux.

A.2. Banc Champ proche

A.2.1. Présentation du banc de mesure

Le but de ce banc de mesure est de pouvoir mesurer la répartition d'énergie dans la lame de verre et d'évaluer le confinement du signal dans la couche mince de haut indice de réfraction située à la surface de cette dernière.

Ce banc utilise un spectrographe à fibre afin de collecter le signal en bout de lame ainsi qu'une voie de référence afin de pouvoir normaliser les niveaux de signal des plots fluorescents entre eux.

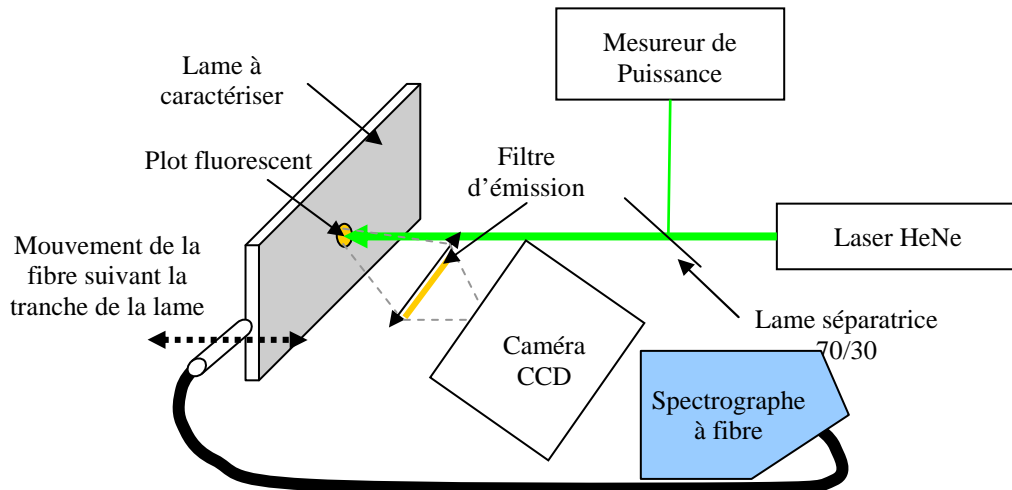


Figure A.3. Schéma du banc "champ proche". Ce banc est constitué d'un laser comme source d'excitation, d'un système d'imagerie normal au substrat et d'un système de mesure en champ proche en sortie de lame résolue spectralement.

A.2.2. Matériel

Le dispositif d'excitation des plots fluorescents est composé :

- d'un laser Hélium Néon Melles Griot 05-LGP-193, dont la longueur d'onde d'émission est $\lambda_{\text{exc}} = 543,5$ nm et la puissance maximale $P_{\text{max}} = 5$ mW,
- d'un mesureur de puissance Anristu, Optical Handy Power Meter ML9002A, afin de contrôler la puissance du laser.

Deux systèmes de collection sont utilisés, l'un normal à la lame de verre qui nous sert de voie de référence, et l'autre en bout de lame afin de mesurer la répartition de l'énergie selon la tranche de la lame.

Le système d'imagerie positionné perpendiculairement au substrat est composé :

- d'une caméra CCD Hi-Sis 23E de EuroPixel,
- d'un objectif Canon : $f' = 50$ mm, 1 : 1.2 et d'un objectif Computar : $f' = 25$ mm, 1 : 1.4 montés en doublet afin d'obtenir un grandissement de 2,
- d'un filtre coloré passe haut BA590 (Schott) positionné entre les deux objectifs du doublet.

Le système de collection en bout de lame est, quant à lui, constitué :

- d'un spectrographe à fibre refroidie ANDOR Shamrock SR-163 (SR163-GRT-0300-0500) possédant un

réseau de 300 L/mm et une fente de $100\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ mm}$ (SR1-SLT-0100-3) pour une résolution de 0,5 nm sur une plage de longueur d'onde de 350 à 750 nm,

- d'une fibre optique monomode de $8\text{ }\mu\text{m}$ de cœur,
- d'un platine de translation motorisée Newport MFA25-CC possédant une résolution de mouvement de 100 nm sur une course de 25 mm afin de déplacer la fibre selon la tranche de la lame.

Enfin, la lame de verre est montée sur deux platines de translation manuelles en configuration XZ afin de pouvoir aisément faire correspondre la position du spot d'excitation du laser qui est fixe avec la position du plot fluorescent sur la lame.

A.2.3. Protocole de mesure

Les mesures réalisées sur ce banc ont été menées de la manière suivante :

Pour chaque position de fibre en face de la lame on acquiert :

- 5 spectres à l'aide du spectrographe à fibre,
- 5 images à l'aide de la caméra.

Le pas de déplacement de la fibre face à la lame est de $10\text{ }\mu\text{m}$ et est réalisé grâce à la platine de translation motorisé.

Les mesures réalisées à l'aide de la caméra sont dépouillées d'une manière analogue à celle décrite pour les mesures en épi-fluorescence du banc microscope (voir § A.1.3).

Une moyenne des 5 spectres acquis pour chaque position de la fibre est ensuite réalisée. On y soustrait alors le signal d'offset mesuré sur un domaine ne percevant ni signal de fluorescence ni signal d'excitation, c'est-à-dire, pour nos expériences, sur le domaine 300 – 500 nm. On intègre ensuite les spectres obtenus sur le domaine de transmission du filtre en émission actuellement utilisé dans l'instrument développé au laboratoire.

Du fait de la taille de la fibre vis-à-vis de la taille des couches minces à caractériser, une méthode de déconvolution est ensuite effectuée afin de remonter à la répartition de l'énergie dans la lame. Cette méthode de déconvolution consiste à considérer chaque point en sortie de lame comme une source ponctuelle émettant dans un angle solide défini par l'ouverture numérique en sortie de couche mince ou en sortie de lame suivant sa position. Cette méthode est détaillée dans le chapitre 3 (§ 2.3.4.4) et peut se résumer sur le schéma suivant :

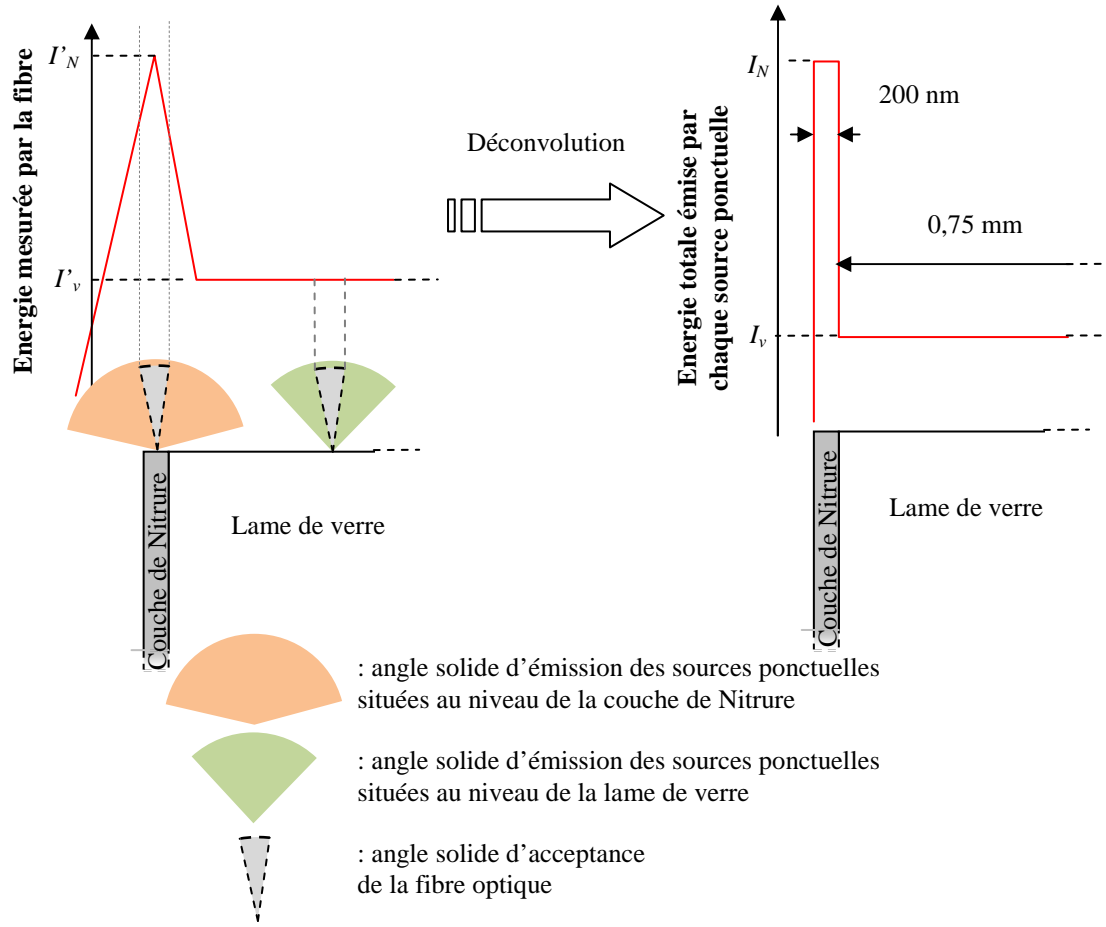


Figure A.4. Illustration de la méthode de déconvolution effectuée afin de remonter à l'énergie confinée dans la couche de Nitrure et celle guidée dans la lame de verre. I'_N et I'_v représentent les intensités maximales mesurées par la fibre face à la couche mince de Nitrure et face à la lame de verre et I_N et I_v représentent les intensités totales (intégrées sur leurs angles solides d'émission) de l'émission de chacune des sources ponctuelles situées respectivement à la sortie de la couche de Nitrure et de la lame de verre.

L'ouverture numérique en sortie de la couche de Nitrure est définie à partir de la relation donnant l'ouverture numérique d'une guide plan symétrique à saut d'indice de réfraction :

$$O.N. = \sqrt{n_{\text{coeur}}^2 - n_{\text{gaine}}^2} \quad \text{Eq. A.3}$$

où n_{coeur} est ici l'indice de réfraction de la couche de Nitrure ($n_4 = 1,95$ ou $2,2$) et $n_{\text{gaine}} = n_3$ ou n_5 . Dans ces deux cas, l'ouverture numérique du guide de Nitrure est supérieure à un et donc on peut considérer que l'émission des sources en sortie de la couche mince se fait dans tout le demi-espace soit dans un angle solide de 2π sr.

L'ouverture numérique de la lame est définie, quant à elle, à partir de l'angle limite de réflexion totale θ_c entre la lame (milieu 5) est le milieu 3 :

$$\theta_{\text{verre}} = \arcsin\left(\frac{n_{\text{ext}}}{n_5} \sin\left(\frac{\pi}{2} - \theta_c\right)\right) \quad \text{Eq. A.4}$$

Etant donné que $n_3 = 1,33$, $n_{\text{ext}} = 1$ et $n_5 = 1,51$ (voir Figure A.5), on trouve que $\theta_{\text{verre}} \approx 45,6^\circ$ soit un angle solide d'émission de 1,9 sr.

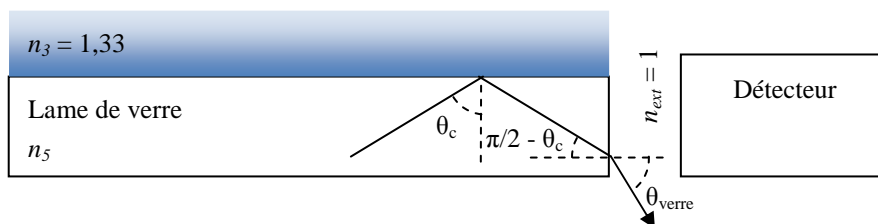


Figure A.5. Schéma représentant les deux milieux extérieurs à considérer lors de la propagation de la lumière dans la lame de verre d'une part, et d'autre part lors de la sortie du signal vers le détecteur.

Enfin, la fibre étant ouverte à 0,22, son angle solide d'acceptance est de 0,12 sr.

A.3. Banc Spectrogoniomètre

A.3.1. Présentation de banc de mesure

Le principe de ce banc de mesure est de mesurer le spectre d'émission de sources de lumière (OLED ou cavité Fabry Péro) en fonction de leur angle d'émission.

Le schéma de ce banc de mesure est le suivant :

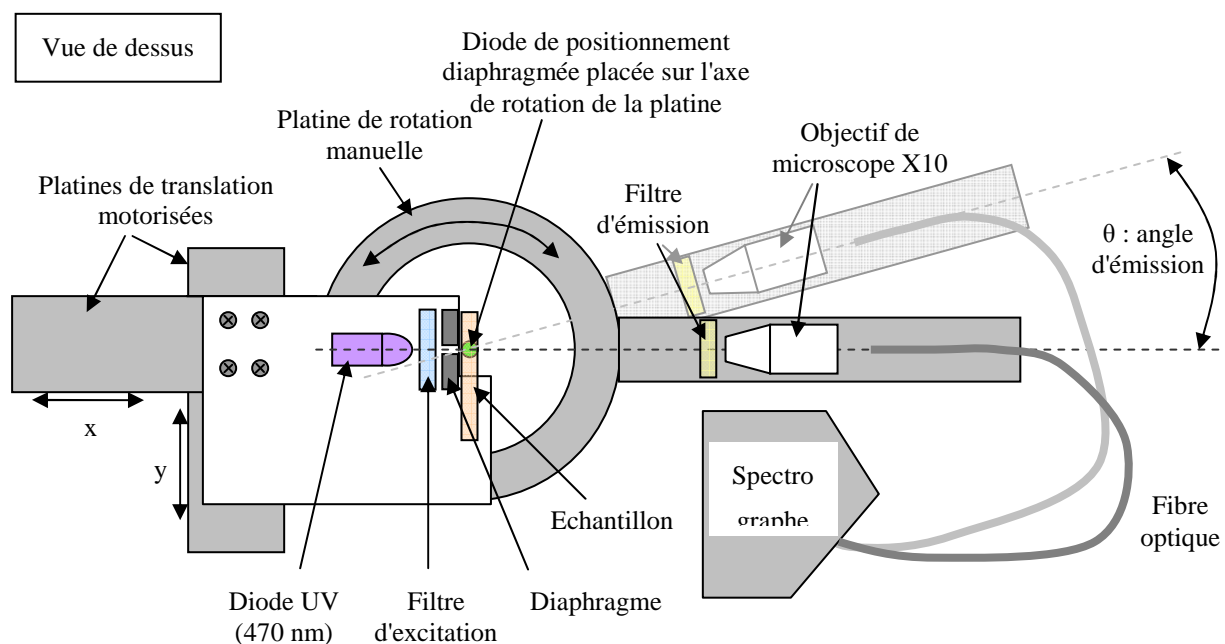


Figure A.6. Schéma de principe du banc de mesure "spectrogoniométrique" développé pour la caractérisation des effets d'une cavité Fabry Péro sur les propriétés d'émission d'une OLED. Ce banc composé d'un goniomètre et d'un spectromètre à fibre permet de caractériser à la fois les propriétés spectrale et spatiale d'émission des échantillons testés.

A.3.2. Matériel

Le dispositif d'excitation des échantillons est composé :

- d'une diode d'excitation UV TOYODA centré à 370 nm et émettant dans un cône de demi angle au sommet de 20. Cette diode est alimentée avec une tension de 5V et est mise en série avec une résistance de 180 Ohm,
- un filtre d'excitation interférentiel : 330WB80 (omega optical),
- d'un diaphragme de 5 mm de diamètre afin de définir une zone d'excitation plus petite que la largeur des marches de nos échantillons,
- d'un générateur de courant Elc AL991s pour l'alimentation de la diode. Ce générateur a aussi été utilisé directement pour exciter les OLED pompées électriquement réalisées par le DIHS lors de leur caractérisation.

Ce dispositif d'excitation est positionné sur deux platines de translation motorisées Newport MFA25-CC afin de permettre de déplacer l'échantillon et l'axe optique de la diode d'excitation au niveau de l'axe de rotation.

La platine de rotation utilisée est une platine manuelle Newport M-UTR46S au centre de laquelle a été positionnée une diode verte de faible puissance afin de pouvoir situer l'axe de rotation de la platine.

Enfin, le système de collection de la lumière est composé :

- d'un bras déporté X29 fixe par rapport à la platine de rotation. Cet axe peut donc tourner autour de l'axe de rotation de la platine afin de collecter la lumière émise par l'échantillon et ce en fonction de son angle d'émission,
- d'un filtre d'émission passe haut de longueur d'onde de coupure de 400 nm : XF3097 (Schott),
- d'un objectif de microscope Olympus x10 0.30, UMPlanFI qui permet de focaliser la lumière collectée dans la fibre optique du spectrographe,
- d'une fibre optique multimode de diamètre de cœur de 125 μm
- d'un spectrographe à fibre refroidi ANDOR Shamrock SR-163 (SR163-GRT-0300-0500) possédant un réseau de 300 L/mm et une fente de 100 μm x 3 mm (SR1-SLT-0100-3) pour une résolution de 0,5 nm sur une plage de longueur d'onde de 350 à 750 nm.

A.3.3. Protocole de mesure

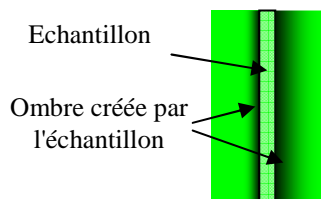
Afin de mesurer précisément le diagramme d'émission de l'échantillon, il est nécessaire que ce dernier soit positionné exactement sur l'axe de rotation de la platine de rotation, que le spot d'excitation intercepte l'échantillon au niveau de cet axe de rotation, et que le dispositif de collection de la lumière (objectif de microscope et fibre optique) soit toujours pointé vers ce même axe.

Tout d'abord, la réalisation mécanique de notre banc fait que les éléments de collection de la lumière pointent systématiquement l'axe de rotation de la platine.

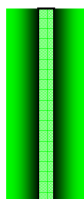
D'autre part, nous avons placé, par conception mécanique, une diode électroluminescente sur l'axe de rotation de la platine afin de pouvoir y positionner précisément notre échantillon grâce aux deux platines de translations motorisées. En effet, l'ombre de l'échantillon créée par la diode nous permet de situer l'axe de rotation de la

platine et donc d'y positionner notre échantillon (voir Figure A.7).

a) Mauvais positionnement



b) Bon positionnement



c) Mauvais positionnement

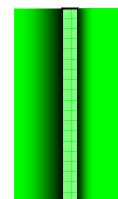


Figure A.7. Illustration de l'ombre créée par l'échantillon au dessus de la diode située sur l'axe de rotation de la platine. Lorsque l'échantillon est positionné exactement au dessus de cet axe de rotation, l'ombre créée par l'échantillon est alors également répartie des deux côtés de l'échantillon (cas b).

Enfin, ce jeu de platine de translation permet aussi de positionner l'axe optique de la diode d'excitation au niveau de l'axe optique des éléments de collection du signal (objectif de microscope et fibre optique) et donc sur l'axe de rotation de platine. Il suffit pour cela de maximiser la collection du signal d'excitation lorsque ce dernier n'est pas filtré par le filtre en émission situé devant l'objectif de microscope.

Après avoir aligné l'échantillon, la source d'excitation et le bras de détection par rapport à l'axe de rotation de la platine, les mesures sont effectuées de la manière suivante :

- acquisition d'un spectre de noir, c'est-à-dire avec la diode UV éteinte et le bras de mesure normal à l'échantillon ($\theta = 0^\circ$),
- acquisition d'une mesure pour chaque position du bras de mesure ($0^\circ, 5^\circ, 10^\circ, 15^\circ, 20^\circ, 25^\circ, 30^\circ, 35^\circ, 40^\circ, 50^\circ, 60^\circ$) avec une alimentation de la diode UV de 5V.
- acquisition d'une mesure pour $\theta = 0^\circ$ afin d'estimer la perte de signal due à l'excitation prolongée de la couche émettrice (phénomène de phot blanchiment, tenu dans le temps à l'aire libre, ...).

Le dépouillement de ces mesures est ensuite réalisé de la façon suivante :

- Filtrage des données à partir d'une médiane mobile effectué sur 20 points (la résolution du spectrographe étant de 0,47 nm). Pour cela on utilise la fonction medfilt1 sous Matlab.
- Estimation de l'offset dans la bande 250-350 nm qui ne reçoit aucun rayonnement. Pour cela on calcul la médiane des données filtrées dans cet intervalle.
- Soustraction de l'offset à l'ensemble des données filtrées.
- ajustement des données filtrées à l'aide d'un polynôme de degré 20.
- Le diagramme d'émission est ensuite calculé en intégrant les différents spectres obtenu pour un échantillon entre deux longueurs d'onde que l'on définit en fonction du mode de cavité que l'on veut caractériser. Généralement on a effectué cette intégration sur le domaine $\lambda_{em} \pm 2 \text{ nm}$, où λ_{em} est la longueur d'onde de résonance de la cavité à 0° , afin de mesurer le diagramme d'émission de la résonance principale de la cavité.

Annexe B. Détermination de la densité de puissance spectrique d'une source

Soit une source caractérisée par une densité de puissance D_{pex} mesurée après le filtre d'excitation pour une surface de 1 mm² et à une distance e de la source.

Compte tenu des non linéarités importantes des mesureurs de puissance selon la longueur d'onde, la méthode que l'on va décrire ici permet de déterminer la densité de puissance spectrique de la source sans utiliser de spectromètre calibré en puissance.

La distribution spectrale de la densité de puissance de la source peut être calculée en utilisant les spectres normalisés de la source et du filtre d'excitation. Définissons la surface $\underline{\Sigma}$ du spectre de la source normalisée à 1 filtrée entre les longueurs d'onde de coupure basse et haute du filtre d'excitation :

$$\underline{\Sigma} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \underline{S}(\lambda) \cdot \underline{T_{Fex}}(\lambda) \cdot d\lambda \quad \text{Eq. B.1}$$

où λ_1 et λ_2 sont les longueurs d'onde de coupure basse et haute du filtre d'excitation (en m), S le spectre d'émission de la source normalisé à 1 et T_{Fex} est le spectre de transmission du filtre d'excitation normalisé à 1

En supposant que la réponse du mesureur de puissance est linéaire dans l'intervalle $[\lambda_1; \lambda_2]$ ($\Delta\lambda \approx 40$ nm), la densité de puissance mesurée au niveau d'un plot est proportionnelle à cette surface :

$$D_{pex} = \alpha_{ex} \cdot \underline{\Sigma} \quad \text{Eq. B.2}$$

où α_{ex} est le facteur de proportionnalité liant les deux grandeurs.

soit :

$$\alpha_{ex} = \frac{D_{pex}}{\underline{\Sigma}} \quad \text{Eq. B.3}$$

En l'absence de filtre, on a :

$$\Sigma' = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\underline{S}(\lambda) \cdot T_{Fex}(\lambda)}{T_{Fex}(\lambda)} \cdot d\lambda \quad \text{Eq. B.4}$$

et :

$$\alpha_s = \frac{D_{Pex}}{\Sigma'} \quad \text{Eq. B.5}$$

où :

- Σ' est la surface du spectre de la source non filtrée entre les longueurs d'onde de coupure basse et haute du filtre d'excitation,
- T_{Fex} est le spectre de transmission du filtre (non normalisé), spectre expérimental (impératif)
- α_s le facteur permettant de déterminer la densité de puissance de la source pour chaque intervalle de longueur d'onde (analogue de α_{ex} avec filtre, voir équation B.3).

La densité de puissance d'émission de la source en fonction de la longueur d'onde est alors (sans le filtre d'excitation) donnée par :

$$D_p(\lambda) = \alpha_s \cdot \underline{S}(\lambda) \quad \text{Eq. B.6}$$

Références

- Adachi 1989 C. Adachi, T. Tsutsui, S. Saito.
Organic electroluminescent device having a hole conductor as an emitter layer.
1989 Appl. Phys. Lett. **55**(15): 1489
- Adachi 1990 C. Adachi, T. Tsutsui, S. Saito.
Blue Light-emitting organic electroluminescent devices.
1990 Appl. Phys. Lett. **56**(9): 799
- Axelrod 1976 D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, W. W. Webb.
Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.
1976 Biophys. J. **16**:1055-1069
- Barnes 1998 W.L. Barnes.
Topical Review: Fluorescence near interfaces: the role of photonic mode density.
1998 Journal of Modern Optics **45**(4): 661-699
- Barritault 2002 P. Barritault.
Mesure et modélisation de la fluorescence sur support solide; application à l'étude des biopuces à ADN.
2002 Thèse de Doctorat, Optique, Optoelectronique et microondes, INPG/Grenoble
- Benisty 1998 a H. Benisty, R. Stanley, M. Mayer.
Method of source terms for dipole emission modification in modes of arbitrary planar structures.
1998 J. Opt. Soc. Am. A **15**(5): 1192-1201
- Benisty 1998 b H. Benisty, H. De Neve, C. Weisbuch.
Impact of planar microcavity effects on light extraction Part I: Basic concepts and analytical trends.
1998 IEEE Journal of Quantum Electronics, **34**(9): 1612-1631
- Benisty 1998 c H. Benisty, H. De Neve, C. Weisbuch.
Impact of planar microcavity effects on light extraction Part II: Selected exact simulations and role of photon recycling.
1998 IEEE Journal of Quantum Electronics, **34**(9): 1632-1643
- Berggren 1996 M. Berggren, O. Inganäs, T. Granlund, S. Guo, G. Gustafson, M.R. Andersson.
Polymer light emitting diodes placed in microcavities.
1996 Synt. Met. **76**: 121-123

- Bernanose 1953 A. Bernanose, P. Vouaux.
1953 J. Chim. Phys. **50**: 261-3
- Björk 1991 G. Björk, S. Machida, Y. Yamamoto, K. Igeta.
Modification of spontaneous emission rate in planar dielectric microcavity structures.
1991 Physical Review **44**(1): 669-681
- Blue 2005 R. Blue, N. Kent, L. Polerecky, H. McEvoy, D. Gray, B.D. MacCraith.
Platform for enhanced detection efficiency in luminescence based sensors.
2005 Electronics Letters, **41** (12)
- Bras 2004 M. Bras, V. Dugas, F. Bessueille, J.P. Cloarec, J.R. Martin, M. Cabrera, J.P. Chauvet, E. Souteyrand, M. Garrigues.
Optimisation of silicon/silicon dioxide substrate for fluorescence DNA microarray.
2004 Biosensors and Bioelectronics **20**: 797-806
- Braun 1991 D. Braun, A.J. Heeger.
Visible light emission from semiconducting polymer diodes.
1991 Appl. Phys. Lett. **58** (18): 1982-1984
- Brecht 1995 A. Brecht, G. Gauglitz.
Optical probes and transducers.
1995 Biosensors and Bioelectronics **10**: 923-936
- Brown 1993 E.R. Brown, C.D. Parker, E Yablonovitch.
Radiation properties of a planar antenna on a photonic-crystal substrate.
1993 J. Opt. Soc. Am. B **10**(2): 404-407
- Bulović 2007 V. Bulović.
Organic and Nanostructured Materials in Optoelectronic Applications: Physical Processes and Active Devices.
2007 RLE Progress Report 148 Chapitre 24-9
- Burroughes 1990 J. H. Burroughes, D.D.C. Bradley, A.R. Brown, R.N. Marks, K. Mackay, R.H. Friend, P.L. Burns, A.B. Holmes.
Light emitting diodes based on conjugated polymer.
1990 Nature **347**:539
- Cardullo 1988 R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf.
Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.
1988 PNAS **85**(23): 8790-8794.
- Carniglia 1972 C.K. Carniglia, L. Mandel, K.H. Drexhage.
Absorption and emission of evanescent photons.
1972 J. Opt. Soc. Am. **62**(4): 479-486
- Castro 2004 A. Castro, D.A.R. Dalvit, L. Paz-Matos.
Ultrasensitive detection of DNA sequences in solution by specific enzymatic labelling.
2004 Anal. Chem. **76**: 4169-4174

- Challener 2000 W.A. Challener, J.D. Edwards, R.W. McGowan, J. Skorjanec, Z. Yang.
A multilayer grating-based evanescent wave sensing technique.
2000 *Sensors and Actuators B* **71**: 42-46
- Chance 1975 R.R. Chance, A. Prock, R. Silbey.
Comments on the classical theory of energy transfert.
1975 *J. Chem. Phys.* **62**(6): 2245-2253
- Chance 1978 R.R. Chance, A. Prock, R. Silbey.
Molecular fluorescence and energy transfer near interfaces.
1978 *Advances in Chemical Physics*, DOI: 10.1002/9780470142561.ch1
- Chediak 2004 J.A Chediak, Z. Luo, J. Seo, N. Cheung, L.P. Lee, T.D. Sands.
Heterogeneous integration of CdS filters with GaN LEDs for fluorescence detection Microsystems.
2004 *Sensors and Actuators A: Physical*, **111**(11): 1-7
- Cheng 2006 G. Cheng, Y. Zhang, Y. Zhao, Y. Lin, C. Ruan, S. Liu, T. Fei, Y. Ma, Y. Cheng.
White organic light emitting devices with a phosphorescent multiple emissive layer.
2006 *eAppl. Phys. Lett.* **89**:043504
- Choudury 2004 B.J. Choudury, R. Shinar, J. Shinar.
Luminescent chemical and biological sensors based on the structural integration of an OLED excitation source with a sensing component.
2004 *Proceedings of the SPIE* **5214**: 64-72
- Coe 2002 S. Coe, W.K. Woo, M. Bawendi, V. Bulović
Electroluminescence from single monolayer of nanocrystals in molecular organic devices.
2002 *Natures* 420(6917): 800-803
- Davila 2007 A.P. Davila, J. Jang, A.K Gupta, T. Walter, A. Aronson, R. Bashir.
Microresonator mass sensors for detection of Bacillus anthracis Sterne spores in air and water.
2007 *Biosensors and Bioelectronics* **22**: 3028-3035
- Deppe 1991 a D.G. Deppe, C. Lei.
Spontaneous emission from a dipole in a semiconductor microcavity.
1991 *J. Appl. Phys.* **70**(7) : 3443-3448
- Deppe 1991 b D.G. Deppe, C. Lei.
Spontaneous emission and optical gain in a Fabry-Perot microcavity.
1991 *Appl. Phys. Lett.* **60**(5) : 527-529
- Deppe 1994 D.G. Deppe, C. Lei, C.C. Lin, D.L. Huffaker.
Spontaneous emission from planar microstructures.
1994 *Journal of Modern Optics* **41**(2): 325-344
- Destriau 1936 G. Destriau.
1936 *J. Chim. Phys.* **33**: 587

- Dill 2004 K. Dill, D.D. Montgomery, A.L. Ghindilis, K.R. Schwarzkopf, S.R. Ragsdale, A.V. Oleinikov.
Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays.
2004 *Biosensors and Bioelectronics* **20**(4): 736-742.
- Dirr 1997 S. Dirr, S. Wiese, H.H. Johanes, D. Ammermann, A. Böhler, W. Grahn, W. Kowalsky.
Luminescence enhancement in microcavity organic multilayer structures.
1997 *Synthetic Metals* **91**: 53-56
- Dodabalapur 1994 a A. Dodabalapur, L.J. Rothberg, T.M. Miller, E.W. Kwock.
Microcavity effects in organic semiconductors.
1994 *Appl. Phys. Lett.* **64**(19): 2486
- Dodabalapur 1994 b A. Dodabalapur, L.J. Rothberg, T.M. Miller.
Color variation with electroluminescent organic semiconductors in multimode resonant cavities.
1994 *Appl. Phys. Lett.* **65**(18): 0003-6951
- Dodabalapur 1996 A. Dodabalapur, L.J. Rothberg, R.H. Jordan, T.M. Miller, R.E. Slusher, J. M. Phillips.
Physics and applications of organic microcavity light emitting diodes.
1996 *J. Appl. Phys.* **80**(12): 6954-6964
- Drexhage 1974 K.H. Drexhage.
Interaction of light with monomolecular dye layers.
1974 E. Wolf, *Progress in Optics* XII: 165-229
- Du Bouëtiez 2006 D. du Bouëtiez de Keroroguen.
Conception d'un lecteur de biopuce multiplexe.
2006 Diplôme de recherche technologique, INPG/Grenoble
- Enderlein 1999 J. Enderlein, T. Ruckstuhl, S. Seeger.
Highly efficient optical detection of surface generated fluorescence.
1999 *Applied Optics* **38**(4): 724-732.
- Fermi 1932 E. Fermi.
Quantum theory of radiation.
1932 *Reviews of Modern Physics* **4**: 87-132
- Fisher 1995 T.A. Fisher, D.G. Lidzey, M.A. Pate, M.S. Weaver, D.M. Whittaker, M.S. Skolnick, D.D.C. Bradley.
Electroluminescence from a conjugated polymer microcavity structure.
1995 *Appl. Phys. Lett.* **67**(10): 1355
- Ford 1984 G.W. Ford, W.H. Weber.
Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces.
1984 *Physics Reports* **113**(4): 195-287
- Forsythe 2000 E.W. Forsythe, M.A. Abkowitz, Y. Gao.
Tuning the carrier injection efficiency for organic light emitting diodes.
2000 *J. Phys. Chem. B* **104**: 3948-3952

- Friend 1999 R.H. Friend, R.W. Gymer, A.B. Holmes, J.H. Burroughes, R.N. Marks, C.Taliani, D.D.C. Bradley, D.A. Dos Santos, J.L. Brédas, M. Lögdlund, W.R. Salaneck.
Electroluminescence in conjugated polymers.
1999 *Nature* **397**: 121-128
- Fung 1978 B.K.K. Fung, L. Stryer.
Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer.
1978 *Biochemistry* **17**: 5241-5248
- Gachet 2004 D. Gachet.
Etude de la faisabilité d'un biocapteur ADN en optique intégré sur verre.
2004 Projet de fin d'étude, DEA Optique et Photonique, Institut de Microélectronique, Electromagnétisme et Photonique.
- Galland 2004 R. Galland.
Mise au point d'un lecteur optique de fluorescence pour des immuno-analyses adaptés à des applications hors laboratoire.
2004 Projet de fin d'étude, DEA Optique et Photonique, CEA Grenoble.
- Golden 2005 J. P. Golden, C. R. Taitt, L. C. Shriver-Lake, Y. S. Shubin, F. S. Ligler.
A portable automated multianalyte biosensor.
2005 *Talanta* **65**: 1078-1085
- Gouin 1998 J.F. Gouin, A. Doyle, B.D MacCraith.
Fluorescence capture by planar waveguide for optical sensors.
1998 *Electronics Letters* **34** (17): 1685-1687
- Han 2005 S. Han, C. Huang, Z.H. Lu.
Color tunable metal cavity OLED with fullerene layer.
2005 *J. Of Appl. Phys.* **97**: 093102
- Hellen 1987 E.H. Hellen, D. Axelrod.
Fluorescence emission at dielectric and metal film interfaces.
1987 *J. Opt. Soc. Am. B* **4**(3):337-350
- Hoa 2007 X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian.
Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress.
2007 *Biosensors and Bioelectronics*, **23**(2): 151-160
- Hofmann 2002 O. Hofmann, G. Voirin, P. Niedermann, A. Manz.
Three-dimensional microfluidic confinement, for efficient sample delivery to biosensors surfaces. Application to immunoassays on planar optical waveguide.
2002 *Anal. Chem.* **74**: 5243-5250
- Hofmann 2006 O. Hofmann, X. Wang, A. Cornwell, S. Beecher, A. Raja, D.D.C. Bradley, A.J. deMello, J.C. deMello.
Monolithically integrated dye doped PDMS long pass filters for disposable on chip fluorescence detection.
2006 *Lab Chip* **6**: 981-987
- Holland 1985 W.R. Holland, D.D Hall.
Waveguide mode enhancement of molecular fluorescence.
1985 *Optics Letters* **10**(8): 414-416

- Huang 2003 Q. Huang, J. Cui, J.G.C. Veinot, H. Yan, T.J. Marks.
Realization of high-efficiency/high-luminance small molecule OLED: synergistic effects of siloxane anode functionalization/HIL, and hole/exciton blocking/electron transport layers.
2003 Appl. Phys. Lett. **82**(3): 331
- Ingenhoff 1993 J. Ingenhoff, B. Drapp, G. Gauglitz.
Biosensors using integrated optical devices.
1993 Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **346**(6-9): 580-583
- Jaffrezic-Renault 1999 N. Jaffrezic-Renault, A. Senillou, C. Martelet, K. Wan, J.M. Chovelon.
ISFET microsensors for the detection of pollutants in liquid media.
1999 Sensors and Actuators B **59**: 154164
- Jakubiak 2005 R. Jakubiak, V.P. Tondiglia, L.V. Natarajan, R.J. Sutherland, P. Lloyd, T.J. Bunning, R.A. Vaia.
Dynamic lasing from all organic two dimensional photonic crystals.
2005 Adv. Mater. **17**: 2807-2811
- Jou 2006 J. H. Jou, M. C. Sun, H. H. Chou, C. H. Li.
Efficient pure white organic light emitting diodes with a solution processed, binary host employing single emission layer.
2006 Appl. Phys. Lett., **88**: 141101
- Kalinowski 1999 J. Kalinowski.
Electroluminescence in organics.
1999 J. Phys D: Appl. Phys. **32**: R179-R250
- Kanno 2005 H. Kanno, Y. Sun, S. R. Forrest.
High efficiency top emissive white light emitting organic electrophosphorescent devices.
2005 Appl. Phys. Lett. **86**: 263502
- Kim 2005 S. Y. Kim, J. M. Baik, H. K. Yu J. L. Lee.
Highly efficient organic light emitting devices with hole injection layer of transition metal oxides.
2005 J. of Appl. Phys. **98**: 093707
- Kraft 1998 A. Kraft, A. C. Grimsdale, A. B. Holmes.
Electroluminescence conjugated polymer - Seeing polymer in a new light.
1998 Angew. Chem. Int. Ed. **37**: 402-428
- Labeye 2002 P. Labeye, P. Pouteau, F. Perraut, F. Ginot
Dispositif de lecture de fluorescence intégrée
2002 Brevet FR 2846420
- Lakowicz 1983 J. R. Lakowicz.
Principles of fluorescence spectroscopy I.
1983 Plenum Press, New York, QD96.F56L34, ISBN 0-306-41285-3, Chap. 1, 9 et 10
- Lakowicz 2003 J.R. Lakowicz, J. Malicka, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, C.D. Geddes.
Radiative decay engineering: the role of photonic mode density in biotechnology.
2003 J. Phys. D: Appl. Phys. **36**: R240-R249

- Lee 2003 Y.J. Lee, S.H. Kim, J. Huh, G.H. Kim, Y.H. Lee, S.H. Cho, Y.H. Kim, Y.R. Do.
A high extraction efficiency nanopatterned organic light emitting diode.
2003 *Applied Physics Letters* **82**(21): 3779-3781
- Lehr 2003 H. Lehr, A. Brandenburg, G. sulz.
Modeling and experimental verification of the performance of TIRF-sensing systems for oligonucleotide microarrays based on bulk and integrated optical planar waveguides.
2003 *Sensors and Actuators B-Chemical* **92**(3): 303-314
- Lemmer 1995 U. Lemmer, R. Hennig, W. Guss, A. Ochse, J. Pommerehne, R. Sander, A. Greiner, R.F. Marht, H. Bäessler, J. Feldmann, E.O. Göbel.
Microcavity effects in a spin coated polymer two layer system.
1995 *Appl. Phys. Lett.* **66**(11): 1301
- Ligler 2002 F.S. Ligler, C.A Rowe Taitt.
Optical biosensors : present and future.
2002 Elsevier Science ISBN: 0444509747
- Ligler 2003 F.S. Ligler, C.R. Taitt, L.C. Shriver-Lake, K.E. Sapsford, Y. Shubin, J.P. Golden.
Array biosensor for detection of toxins.
2003 *Anal. Bioanal. Chem.* **377**: 469-477
- Lin 2006 H.C. Lin, C.M. Tsai, J. T'suen Lin, K.R.J. Thomas.
Novel red and white PLED devices consisting of PVK blended with blue-emitting fluorene derivatives and carbazole dopants.
2006 *Synthetic Metals* **156**: 1155-1160
- Lu 2006 M. Lu, F. Ibraimi, D. Kriz, K. Kriz.
A combination of magnetic permeability detection with nanometer-scale superparamagnetic tracer and its application for one-step detection of human urinary albumin in undiluted urine.
2006 *Biosensors and Bioelectronics* **21**: 2248-2254
- Lukosz 1977 a W. Lukosz, R.E. Kunz.
Fluorescence lifetime of magnetic and electric dipoles near a dielectric interface.
1977 *Optics Communications* **20**(2): 195-199
- Lukosz 1977 b W. Lukosz, R.E. Kunz.
Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. I. Total radiated power.
1977 *JOSA A* **67**(12): 1607-1614
- Lukosz 1979 W. Lukosz.
Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane dielectric interface. III. Radiation patterns of dipole with arbitrary orientation.
1979 *JOSA A* **69**(11): 1495-1503
- Lukosz 1980 W. Lukosz.
Theory of optical environment dependent spontaneous emission for emitters in thin layers.
1980 *Physical Review B* **22**(6): 3030-3038

- Lukosz 1981 W. Lukosz.
Light emission by multipole sources in thin layers. I Radiation patterns of electric and magnetic dipoles.
1981 J. Opt. Soc. Am. **71**(6): 744-754
- Mallard 2005 F. Mallard, G. Marchand, F. Ginot, R. Campagnolo.
Opto-electronic DNA chip : high performance chip reading with hall electric interface.
2005 Biosensors and Bioelectronics **20**(9): 1813-1820
- Marquette 1999 C.A. Marquette, L.J. Blum.
Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples.
1999 Analytica Chimica Acta **381**: 1-10
- Marsoner 1988 H. Marsoner, H. Karpf, A. Leitner.
Sensor element for determination of concentration substances.
1988 Brevet : US 4755667
- Mazurczyk 2006 R. Mazurczyk, J. Vieillard, A. Bouchard, B. Hannes, S. Krawczyk.
A novel concept of the integrated fluorescence detection system and its application in a lab-on-a-chip microdevice.
2006 Sensors and Actuators B **118**: 11-19
- Meyer 2007 M.H.F. Meyer, M. Hartmann, H.J. Krause, G. Blankenstein, B. Mueller-Chorus, J. Oster, P. Miethe, M. Keusgen.
CRP determination based on a novel magnetic biosensor.
2007 Biosensors and Bioelectronics **22**: 973-979
- Misiakos 2004 K. Misiakos, S.E. Kakabakos, P.S. Petrou, H.H. Ruf
A monolithic silicon optoelectronic transducer as a real time affinity biosensor
2004 Anal. Chem. **76**(5): 1366-1373
- Mitschke 2000 U. Mitschke, P. Bäuerle.
The electroluminescence of organic materials.
2000 J. of Mat. Chem. DOI: 10.1039/a908713c
- Mohamed 2007 M. Mohamed
Réalisation d'une source intégrée pour biopuce.
2007 Stage Master, NanoMatériaux et NanoTechnologies, Université Claude Bernard Lyon 1.
- Mujumdar 1993 R.B. Mujumdar, L.A. Ernst, S.R. Mujumdar, C.J. Lewis, A.S. Waggoner.
Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters.
1993 Bioconjugate Chem, **4**(2): 105-111.
- Mulvaney 2007 Mulvaney S.P, Cole C.L, Kniller M.D, Malito M, Tamanaha C.R, Rife J.C, Stanton M.W, Whitman L.J..
Rapid, femtomolar bioassays in complex matrices combining microfluidics and magnetoelectronics.
2007 Biosensors and Bioelectronics **23**(2): 191-200

- Naimushin 2002 A.N. Naimushin, S.D. Soelberg, D.K. Nguyen, L. Dunlap, D. Bartolomew, J. Elkind, J. Melendez, C.E. Furlung.
Detection of Staphylococcus aureus enterotoxin B at femtomolar levels with a miniature integrated two-channel surface plasmon resonance (SPR) sensor.
2002 Biosensors and Bioelectronics **17**: 573-584
- Nakayama 1993 T. Nakayama, Y. Itoh, A. Kakuta.
Organic photo- and electroluminescent devices with double mirrors.
1993 Appl. Phys. Lett. **63**(5): 594
- Neuburger 2006 L. M. Neuburger.
Développement de dosages immunologiques par fluorescence Perspectives pour l'élaboration d'un capteur en flux des agents de la menace
2006 Thèse de doctorat, CEA Saclay, INAPG/Paris
- Neyts 1998 K.A. Neyts.
Simulation of light emission from thin film microcavities.
1998 JOSA A **15**(4): 962-971
- Niua 2008 S. Niua, G. Singha, R.F. Saraf.
Label-less fluorescence-based method to detect hybridization with applications to DNA micro-array.
2008 - Biosensors and Bioelectronics **23**(5): 714-720.
- Novotny 1997 L. Novotny.
Allowed and forbidden light in near fields optics. II. Interacting dipolar particles.
1997 JOSA A **14**(1): 105-113
- Pardo 2000 D.A Pardo, G.E Jabbour, N. Peyghambarian.
Application of screen printing in the fabrication of Organic Light Emitting Devices.
2000 Adv. Mater. **12**(17): 1249-1252
- Park 2002 S. Park, T.A. Taton, C.A. Mirkin.
Array based electrical detection of DNA with nanoparticle probes.
2002 Science **295**(5559): 1503-1506
- Pease 1994 C. Pease, D. Solas, E. J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, S.P. A. Fodor.
Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis.
1994 PNSA **91**: 5022-5026
- Peng 2006 H. Peng, X. Zhu, J. Sun, S. Xie, M. Wong, H.S. Kwok.
Efficient organic light emitting diode using semitransparent silver anode.
2005 Appl. Phys. Lett. **87**: 173505
- Perraut 2002 F. Perraut, A. Lagrange, P. Pouteau, O. Peyssonnet, P. Puget, G. McGall, L. Menou, R. Gonzales, P. Labeye, F. Ginot.
A new generation of scanners for DNA chips.
2002 Biosensors and bioelectronics **17**(9): 803-813
- Pirrung 1996 M.C. Pirrung, C.Y. Huang.
A General Method for the Spatially Defined Immobilization of Biomolecules on Glass Surfaces Using "Caged" Biotin.
1996 - Bioconjugate Chem. **7**(3): 317-321

- Polerecky 2000 L. Polerecky, J. Hamrle, B.D. MacCraith.
Theory of radiation of dipoles placed within a multilayer system.
2000 *Applied Optics* **39**(22): 3968-3977
- Pope 1963 M. Pope, H.P. Kallmann, P. Magnante.
1963 *J. Chem. Phys.* **38**: 2042
- Qiu 2001 C.F. Qiu, L.D. Wang, H.Y. Chen, M. Wong, H.S. Kwok.
Room temperature ultraviolet emission from an organic light emitting diode.
2001 *Appl. Phys. Lett.* **79**(14): 2276
- Rabaste 2003 S. Rabaste.
Microcavités optiques élaborées par voie sol-gel : applications aux ions terre rare d'Eu³⁺ et aux nanocristaux semiconducteurs de CdSe.
2003 Thèse de doctorat, université Claude Bernard Lyon 1,
- Rachet 2007 B. Rachet.
Eclairage évanescent pour l'excitation de fluorescence : détection de marqueurs individuels en environnement fluorescent pour le suivi en temps réel d'une cinétique de réaction biologique.
2007 Thèse de doctorat, Optique et radiofréquence, INPG/Grenoble
- Rebhole 2005 L. Rebhole, T. Gebel, R.A. Yankov, T. Trautmann, W. Skorupa, J. Sun, G. Gauglitz, R. Franck.
Microarrays of silicon-based light emitters for novel biosensor and lab-on-a-chip applications.
2005 *Optical Materials* **25**: 1055-1058
- Reits 2001 E.A. J. Reits, J.J. Neeffjes.
From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.
2001 *Nature Cell Biology* **3**: E145-E147
- Rigneault 1996 H. Rigneault, S. Monneret.
Modal analysis of spontaneous emission in a planar microcavity.
1996 *Physical Review A* **54**(3): 2356-2368
- Rigneault 1997 H. Rigneault, S. Robert, C. Begon, B. Jacquier, P. Moretti
Radiative and guided wave emission of Er³⁺ atoms located in planar multilayer dielectric structures.
1997 *Physical Review A* **55**(2): 1497-1502
- Rigneault 1998 H. Rigneault, S. Maure, C. Amra.
Spontaneous emission in multilayer microcavities: modal theory extended with Fourier-Green analysis for dissipative structures.
1998 *Pure Appl. Opt.* **7**: 549-563
- Robinson 1993 G.A. Robinson, J.W. Attridge, J.K. Deacon, S.C. Whiteley.
The fluorescent capillary fill device.
1993 *Sensors and Actuators B* **11**: 235-238

- Roncali 2007 P. Roncali, B. Tavitian, I. Texier, P. Peltier, F. Perraut, J. Boutet, L. Cognet, B. Lounis, D. Marguet, O. Thoumine, M. Tramier
Chapitre 7 : Les outils optiques
Ouvrage : *Nanobiotechnologies et Nanosciences, Tome 3*
M Lahmani, P. Boisseau, P. Houdy.
2007 Edition Belin, ISSN 1635-8414, ISBN 978-2-7011-4470-2, Chap. 7
- Rowe 1999 C.A. Rowe, L.M. Tender, M.J. Feldstein, J.P. Golden, S.B. Scruggs, B.D. MacCraith, J.J. Cras, F.S. Ligler.
Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes.
1999 Anal. Chem. **71**: 3846-3852
- Ruckstuhl 2000 T. Ruckstuhl, J. Enderlein, S. Jung, S. Seeger.
Forbidden light detection from single molecules.
2000 Anal. Chem. **72**: 2117-2123
- Ruhstaller 2003 B. Ruhstaller, T. Beierlein, H. Riel, S. Karg, J. C. Scott, W. Riess.
Simulating electronic and optical processes in multilayer organic light emitting devices.
2003 IEEE J. of selected topics in quantum electronics **9**(3): 723
- Ruiter 1997 A.G.T. Ruiter, J.A. Veerman, M.F. Garcia-Parajo, N.F. van Hulst.
Single molecule rotational and translational diffusion observed by near field scanning optical microscopy.
1997 J. Phys. Chem. A **101**: 7318-7323
- Sapsford 2002 K.E Sapsford, P.T. Charles, C.H. Patterson Jr., F.S. Ligler.
Demonstration of four immunoassays formats using the array biosensor.
2003 Anal. Chem. **74**: 1061-1068
- Sapsford 2006 K.E. Sapsford, M.M. Ngundi, M.H. Moore, M.E. Lassman, L.C. Shriver-Lake, C.R. Taitt, F.S. Ligler.
Rapid detection of foodborne contaminants using an Array Biosensor
2006 Sensors and Actuators B **113**: 599-607
- Schultz 2003 E. Schultz, F. Perraut, L.M. Neuburger, H. Volland.
Etude d'un système de dosage immunoologique par fluorescence de très haute sensibilité.
2003 Actes du Colloque "Méthodes et techniques optiques pour l'industrie"
- Schultz 2007 E. Schultz, F. Perraut, T. Flahaut, A. Planat-Chrétien, R. Galland, F. Lesbre, A. Hoang, H. Boutal, H. Volland.
A robust fluorescence multiplex immunoassay biosensor designed for field applications.
2007 Solid State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, Transducers'07: 955-958
- Seiler 2006 A.L. Seiler.
Conception et réalisation de guide en optique intégrée pour biopuces à fluorescence.
2006 Thèse de doctorat, Optique et radiofréquence, INPG/Grenoble

- Sheehan 2005 P.E. Sheehan, L.J. Whitman.
Detection limits for nanoscale biosensors.
2005 Nano Letters **5**(4): 803-807
- Sipe 1981 J.E. Sipe.
The dipole antenna problem in surface physics: a new approach.
1981 Surface Science **105**: 489-504
- Sommerfeld 1909 A. Sommerfeld.
Über die Ausbreitung der Wellen in der Drahtlosen Telegraphie.
1909 Ann. Der Physik **28**: 665-739
- Stimpson 1995 D.I. Stimpson, J.V. Hoijer, W.T. Hsieh, C. Jou, J. Gordon, T. Theriault, R. Gamble, J.D. Baldeschwieler.
Real time detection of DNA hybridization and melting on oligonucleotide arrays by using optical waveguides.
1995 PNAS **92**(14): 6379-6383
- Sullivan 1994 K.G. Sullivan, O. King, C. Sigg, D.G. Hall.
Directional enhanced fluorescence from molecules near a periodic surface.
1994 Applied Optics **33**(13): 2447-2454
- Sullivan 1997 K.G. Sullivan, D.G. Hall.
Enhancement and inhibition of electromagnetic radiation in plane layered media I. Plane wave spectrum approach modelling classical effects.
1997 JOSA B **14**(5): 1149-1159.
- Sun 2005 X.Y. Sun, W.L. Li, Z.R. Hong, H.Z. Wei, F.X. Zang, L.L. Chang, Z. Shi, D.F. Bi, B. Li, Z.Q. Zhang, Z.Z. Hu.
Investigation of dye-doped red emitting organic electroluminescent devices with metal-mirror microcavity structure.
2005 J. Appl. Phys. **97**: 103112
- Sun 2006 Y.R. Sun, N.C. Giebink, H. Kanno, B.W. Ma, M.E. Thompson, S.R. Forrest.
Management of singlet and triplet excitons for efficient white organic light-emitting devices.
2006 Nature **440**: 908-912
- Sung 2006 G.Y. Sung, N.M. Park, J.H. Shin, K.H. Kim, T.Y. Kim, K.S. Cho, C. Huh.
Physics and Device Structures of Highly Efficient Silicon Quantum Dots Based Silicon Nitride Light-Emitting Diodes.
2006 IEEE journal of selected topics in quantum electronics, 12(6): 1545-1555
- Taitt 2005 C.R. Taitt, G.P. Anderson, F.S. Ligler.
Evanescent wave fluorescence biosensors.
2005 Biosensors and Bioelectronics **20**: 2470-2487
- Takada 1993 N. Takada, T. Tsutsui, S. Saito.
Control of emission characteristics in organic thin film electroluminescent diodes using a optical microcavity structure.
1993 Appl. Phys. Lett. 63(15): 2032-2034

- Tang 1987 C. W. Tang, S. A. Vanslyke.
Organic electroluminescent diodes.
1987 Appl. Phys. Lett. **51**(12): 913
- Thevenot 2001 D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson.
Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification.
2001 Biosensors and Bioelectronics **16**(1-2): 121-131
- Tokito 1996 S. Tokito, K. Noda, Y. Taga.
Strongly directed single mode emission from organic.
1996 Appl. Phys. Lett. **68**(19): 2633
- Tran 2003 P.T Tran, E.R Goldman, G.P Anderson, J. M Mauro, H.M. Mattoussi.
Application of luminescent CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates in immuno- and fluorescence-quenching assays.
2003 - Proc. SPIE - Nanoscience Using Laser-Solid Interactions., **4636** : 23-30.
- Tschmelak 2005 J. Tschmelak, G. Proll, J. Riedt, J. Kaiser, P. Kraemmer, L. Barzaga, J. S. Wilkison, P. Hua, J.P. Hole, R. Nudd, M. Jackson, R. Abuknesha, D. Barcelo, S. Rodriguez-Mozaz, M.J. Lopez de Alda, F. Sacher, J. Stien, J. Slobodnik, P. Oswald, H. Kozmenko, E. Korenkova, L. Tothova, Z. Krascenits, G. Gauglitz.
Automated Water Analyser Computer Supported System (AWACSS)
Part I: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking.
2005 Biosensors and Bioelectronics **20**: 1499-1508
Part II: Intelligent, remote-controlled, cost effective, on-line, water monitoring measurement system.
2005 Biosensors and Bioelectronics **20**: 1509-1519
- Tsutsui 1994 T. Tsutsui, N. Takada, S. Saito, E. Ogino.
Sharply directed emission in OLED with an optical micricavity structure.
1994 Appl. Phys. Lett. **65**(15): 1868
- Tsutsui 2001 T. Tsutsui, M. Yahiro, H. Yokogawa, K. Kawano, M. Yokoyama.
Doubling coupling out efficeincy in organic light emitting devices using a thin silica aerogel layer.
2001 Adv. Mater. **13**(15): 1149-1152
- Turner 1999 A.P. Turner, B. Shen, S.A. Piletsky.
In vitro diagnostics in diabetes: meeting the challenge.
1999 Clin. Chem. **45**(9): 1596-1601
- Unger 1999 M. Unger, E. Kartalov, C.S. CHiu, A.E. Lester, S.R. Quake.
Single molecule fluorescence observed with mercury lamp illumination.
1999 Biotechniques **27**(5): 1008-1014
- Vo-Dinh 1999 T. Vo-Dinh, J.P. Alarie, N. Isola, D. Landis, A.L. Winterberg, M.N. Ericson.
DNA biochip using a phototransistor integrated circuit.
1999 Anal. Chem. **71**(2): 358-363

- Volland 2005 H. Volland, L.M. Neuburger, E. Schultz, J. Grassi, F. Perraut, C. Créminon.
Solide phase immobilized tripod for fluorescence renewable immunoassay. A concept for continuous monitoring of an immunoassay including a regeneration of the solid phase.
2005 Anal. Chem. **77** (6): 1896-1904
- Weyl 1919 H. Weyl.
Ausbreitung elektromagnetischer wellen uber einem ebenen leiter.
1919 Ann. D. Physik **60**: 481-500
- Wu 2006 C.I. Wu, C.T. Lin, Y.H. Chen, M.H. Chen, Y.J. Lu, C.C. Wu.
Electronic structures and electron-injection mechanisms of cesium-carbonate-incorporated cathode structures for organic light emitting devices.
2006 Appl. Phys. Lett. **88**: 152104
- Yeh 1988 P. Yeh.
Optical waves in layered media.
Chap. 5 : Matrix formulation for isotropic layered media.
1988 Wiley interscience Publication ISBN 01-471-82866-1: 102-117
- Yguerabide 1998 J. Yguerabide, E.E. Yguerabide.
Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications - II. experimental characterization.
1998 Anal. Biochem. **262**(2): 137-156.
- Zuber 1997 E. Zuber.
Approche biométrique de la dynamique de réactions antigène-anticorps, cas de deux systèmes automatisés de suivi en temps réel des cinétiques.
1997 Thèse de Doctorat : Biochimie, Université Claude Bernard Lyon I, 223 p.

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique
ADU	Analogical Digital Unit
ASDI	Antibody Surface Displacement Immunoassay
CCD	Charge Coupled Device
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CVD	Chemical Vapour Deposition
Dip	Dipôle
EIL	Electron Injection Layer
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EML	Emissive Layer
ETL	Electron Transport Layer
FET	Field Effect Transistor
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HIL	Hole Injection Layer
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HTL	Hole Transport Layer
ISO	Isotrope
LCD	Liquid Crystal Display
LED	Light Emitting Device
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
OLED	Organic Light Emitting Device
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentiel d'Hydrogène
PLED	Polymer Light Emitting Device
PMD	Densité de modes photoniques
QdotLED	Quantum Dot based Light Emitting Device
SAW	Surface Acoustic Wave
SNR	Signal to Noise Ratio
SPIT-FRI	Solide Phase Immobilized Tripod for Fluorescence Renewable Immunoassay
SPR	Surface Plasmon Resonance
TE	Transverse Electrique
TM	Transverse Magnétique
UV	Ultra Violet

Liste des notations

$(O, \mathbf{e}_s, \mathbf{e}_p, \mathbf{e}_z)$	Repère orthonormé suivant le point d'observation
$\boldsymbol{\mu}, \boldsymbol{\mu}_a, \boldsymbol{\mu}_e$	Moment dipolaire, d'absorption, d'émission
μ_0, μ_r	Perméabilité magnétique du vide (H.m^{-1}), perméabilité magnétique relative
A	Probabilité d'absorption
$A(\lambda), E(\lambda)$	Spectre d'absorption, d'émission
$A_{\uparrow}, A_{\downarrow}$	Terme source en amplitude propagatif, contrapropagatif
A_i, B_i	Champ électromagnétique propagatif, contrapropagatif
c	Célérité de la, lumière dans le vide (m.s^{-1})
d	Epaisseur (m)
D_l, P_l	Matrice de passage d'une interface, matrice de propagation
D_p	Densité de puissance (W.m^2)
\mathbf{E}, \mathbf{H}	Champ électrique, magnétique
h	Constante de Planck
I	Intensité
$k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$	Constante d'association ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), de dissociation (s^{-1})
\mathbf{k}	Vecteur d'onde
k_r, k_z	Composante radiale du vecteur d'onde, composante normale du vecteur d'onde
N	Nombre de photon (s^{-1})
n_i	Indice de réfraction
P	Puissance
QE	Rendement quantique
$\mathbf{r}(\rho, \theta, z)$	Position dans le plan en coordonnées cylindrique
S	Surface (m^2)
$S(\lambda)$	Spectre d'émission
t	Temps (s)
$T, T(\lambda)$	Transmission, Spectre de transmission
z_{μ}	Altitude du dipôle (m)
γ	Rendement de conversion
$\Gamma_{ij}, \rho(v_{ij})$	Probabilité de transition, Densité de modes photoniques
$\Delta\lambda$	Largeur spectrale (nm)
ϵ_0, ϵ_r	Permittivité diélectrique du vide (F.m^{-1}), permittivité diélectrique relative
η_c	Rendement de collection
η_{fluo}	Rendement de conversion de la fluorescence
θ_i, θ_c	Angle, angle limite de réflexion totale (rad)
$\lambda, \lambda_{\text{em}}, \lambda_{\text{exc}}$	Longueur d'onde, d'émission, d'absorption (nm)
ν_a, ν_e	Fréquence d'absorption, d'émission (s^{-1})

Π	Diagramme d'émission en puissance
σ_a	Section efficace (m ²)
τ	Temps de vie (s)
ω	Pulsation du champ électromagnétique '(rad.s ⁻¹)

Liste des matériaux

Ag	Argent
Al	Aluminium
Alq3	8-tris-hydroxyquinoline Aluminium
C500	Coumarin 500
Cy3	Cyanine 3
ITO	Indium Tin Oxide
K ⁺	Ion Potassium
MgAg	Alliage Manganèse-Argent
MgAl	Alliage Manganèse-Aluminium
Na ⁺	Ion Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
PPV	Poly(p-phenylenevinylene)
Si	Silicium
Si ₃ N ₄	Nitride de Silicium
SiO ₂	Dioxyde de Silicium
TiO ₂	Dioxyde de Titane

Résumé

Afin de répondre aux contraintes des nouveaux champs d'applications des biocapteurs, le laboratoire LISA a développé un lecteur optique de fluorescence pour des immunoanalyses permettant une détection en continue. Cet instrument, dont le support de la réaction biologique est une lame de verre, utilise le couplage de la fluorescence en champ proche dans celle-ci. Mon travail de thèse a consisté à rechercher les possibilités d'améliorer les performances de compacité, de robustesse et d'adaptabilité du système en cherchant à intégrer les sources d'excitation de type OLED dans la lame de verre. La recherche d'une configuration adaptée à nos contraintes de détection nous a d'autre part poussé à étudier la répartition de l'émission de molécules fluorescentes à l'interface d'un substrat stratifié.

Pour ce faire, un modèle théorique basé sur la décomposition en ondes planes de l'émission d'un dipôle a été développé. Ce modèle nous a permis d'étudier à la fois les propriétés d'émission de sources organiques de types OLED ainsi que celles de molécules fluorescentes situées à l'interface d'un milieu massif recouvert ou non par une couche mince.

Une étude expérimentale et théorique de sources organique situées à l'intérieur d'une cavité Fabry Pérót a permis de fournir des réponses concrètes aux deux principaux défauts inhérents aux OLED pour leur intégration, la directivité angulaire d'émission et la largeur spectrale. Enfin, l'étude de lame de verre recouverte par une couche mince de Nitrure de Silicium a montré qu'il était possible d'améliorer le rapport signal sur bruit du détecteur et a permis de valider la configuration de l'instrument mis au point au laboratoire.

Mots clef :

Biocapteurs, fluorescence, Couplage champ proche, OLED, dipôle, cavité Fabry Pérót.

Abstract

To meet requirements of field-oriented applications, the LISA laboratory has developed and characterized a simple, multiplex, and portable array biosensor. Its central element is a glass slide functionalised with different captures probes which acts both as the biological active sensor, and as the waveguide in which the excited fluorescence is guided by total internal reflections to the detector directly interfaced at the end face.

To reach a very low limit of detection and to improve the compactness and robustness of the system, efforts have been focused on how to enhance the efficiency of the transducer device, and on how to integrate the excitation sources in the device component.

Models based on a classical approach and plane wave decomposition has been developed in order to study the emission properties of fluorescent dyes placed at the interface of dielectrics medium and placed inside Fabry Perot cavities.

We also demonstrate with these models and experimental studies that the use of a Silicon Nitride thin layer (Si_3N_4) at the surface of the glass slide enables to improve the signal to noise ratio, thus the detection limit, of the fluorescence signal detected. On the other hand, we demonstrate that the use of microcavities enables to overcome the two principals' issues that could limit the integration of Organic Light Emitting Device (OLED): the low directivity of these kinds of sources and the filtering need of our detection system. That allowed us to validate our instrumental configuration and to define some critical parameters to improve the directionality and the spectral width of OLED for their integration in the device.

Keywords:

Biosensors, fluorescence, near field coupling, OLED, dipole, Fabry Perot cavity